



09/64682

PCT/JP 99/01481

24.03.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 21 MAY 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 3月24日

出願番号

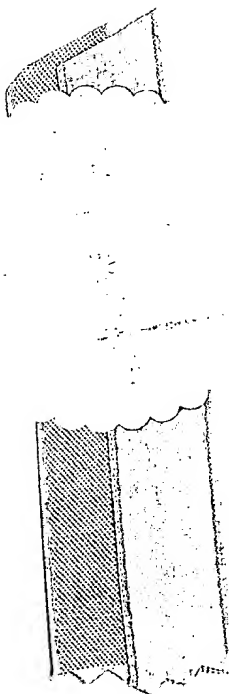
Application Number:

平成10年特許願第096637号

出願人

Applicant(s):

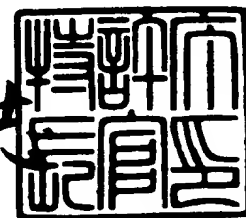
科学技術振興事業団

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 4月30日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3026449

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA906300

【提出日】 平成10年 3月24日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明の名称】 植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子

【請求項の数】 21

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1丁目1番1号 東京大学大学院 農
学生命科学研究科内

【氏名】 森 敏

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1丁目1番1号 東京大学大学院 農
学生命科学研究科内

【氏名】 大木 宏之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1丁目1番1号 東京大学大学院 農
学生命科学研究科内

【氏名】 中西 啓仁

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区弥生1丁目1番1号 東京大学大学院 農
学生命科学研究科内

【氏名】 山口 博隆

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5688-5136

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 039251

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物を形質転換する方法及びその植物並びにその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 有用植物に他の種の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法において、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、当該他の遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される有用植物の mRNA のポリ (A) 付加に関係する要素の領域を、mRNA のポリ (A) 付加に関係しないような他の塩基配列に改変することを特徴とする有用植物を形質転換する方法。

【請求項 2】 導入される他の種の遺伝子が、酵母由来のものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 mRNA のポリ (A) 付加に関係する要素の領域が、A A T A A A 様の塩基配列である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 mRNA のポリ (A) 付加に関係する要素の領域が、G T ーリッチな塩基配列の下流側である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 mRNA のポリ (A) 付加に関係する要素の領域の塩基配列の改変が、形質転換される有用植物のコドン利用率に基づいて行われる請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 塩基配列の改変が、塩基の G 及び T が豊富な領域が少なくなるように行われることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 塩基配列の改変が、導入される遺伝子の全領域にわたって塩基の G 及び C の含有量の差が少ないことを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 塩基配列の改変が、A T T T A 配列を有さないように行われることを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 導入される遺伝子の開始コドンの上流に、コザック配列 (Kozak 配列) を有することを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】 導入される遺伝子が、栄養分の吸収に関与する蛋白質をコ

ードするものである請求項 1～9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】 導入される遺伝子が、三価鉄還元酵素 F R E 1 をコードする遺伝子である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 三価鉄還元酵素 F R E 1 をコードする遺伝子が酵母由来のものである請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 有用植物が、イネ科植物であることを特徴とする請求項 1～12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】 有用植物が、タバコであることを特徴とする請求項 1～12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】 請求項 1～14 に記載の方法により製造され得る形質転換された有用植物。

【請求項 16】 植物が種子である請求項 15 に記載の植物。

【請求項 17】 請求項 1～14 のいずれかに記載の方法で使用され得る塩基配列が改変された塩基配列を有する核酸。

【請求項 18】 核酸が DNA である請求項 17 に記載の核酸。

【請求項 19】 導入されようとする遺伝子が、三価鉄還元酵素 F R E 1 をコードする DNA である請求項 18 に記載の DNA。

【請求項 20】 DNA が配列番号 1 に記載の塩基配列を有するものである請求項 19 に記載の DNA。

【請求項 21】 請求項 17～20 のいずれかに記載の核酸を、数個のフラグメントに分割して、これらのフラグメントを結合させることを特徴とする請求項 17～20 のいずれかに記載の核酸を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、有用植物に他の生物の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法に関し、より詳細には導入される他の生物の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、当該他の生物の遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される有用植物の mRNA のポリ（A）付加に関係する要素の領域

を、mRNAのポリ(A)付加に関係しないような他の塩基配列に改変すること
を特徴とする有用植物を形質転換する方法、それにより製造され得る形質転換さ
れた有用植物、それに使用される塩基配列が改変された核酸、及び、当該核酸の
製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

生物が生育するためには、多くの栄養素が必要である。植物はこれらの生育に
必要な栄養素の大半を根から吸収している。栄養素を吸収するのに必要な各種の
酵素活性が遺伝的に低いために、土壌中にある栄養素を吸収することができない
植物がある。

【0003】

例えば、鉄はほとんどの生物にとって必要不可欠な元素であり、光合成や呼吸
など細胞を機能させるのに関わる多くの酵素に必要である。土壌中の可溶化した
鉄としては、主にFe(III)キレート(場合によってはFe(II)キレート
)として存在している。一般に植物は、Fe(III)に比べてFe(II)が優先
的に吸収されるが、これは植物の種類による。

植物には二種類の鉄の獲得機構、吸収機構(I)(図1参照)と吸収機構(II
) (図2参照)とがある(Mori, 1994)。

【0004】

図1に示される吸収機構(I)は、(1)根圏へのプロトンの放出(Olsen and
Brown 1980)、(2)根の細胞膜における三価鉄還元活性の増加(Brown et al.
1961, Chaney et al. 1972)、(3)還元・キレート性物質の根からの分泌(Het
her et al. 1984)、などからなっている。つまり放出したキレート物質によりFe
(III)をキレート化し、根のフリースペース中のFe(III)-キレートを
細胞膜上で三価鉄還元酵素によってFe(II)に還元し、Fe(II)トランスポ
ーターを通して吸収するという仕組みである。根圏へプロトン放出し、フリー
スペースのpHを下げることで還元酵素の活性を増加させているとも考えられて
いる。しかし、三価鉄の還元活性は高pHで阻害されるため、高濃度の炭酸陰イ
オンによる強いpH緩衝作用により石灰クロロシスを起こす(Marschner et al.

1986) という問題が知られている。

【0005】

また、図2に示される吸収機構(II)は、イネ科植物に特有のもので、(1) ムギネ酸類(phytosiderophore)の合成、(2)根圏へのムギネ酸類の放出、(3)鉄とムギネ酸類との可溶性複合体の形成、(4)植物体によるムギネ酸類-鉄複合体の吸収、とからなっている(Takagi 1976, Takagi et al. 1984)。イネ科植物などにみられるこのような吸収機構(II)による鉄獲得機構は、高pHに阻害されないという長所がある。

【0006】

一方、真核生物のモデルとして知られる酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は前記した吸収機構(I)に類似した鉄吸収を行う。高等植物における遺伝子レベルでの研究はFe(II)のトランスポーターが酵母の鉄吸収変異株のコンプリメンテーションによってクローニングされている(Eide et al., 1996)が、まだ細かい鉄吸収のシステムについては調べられていない。

それに対して酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)ではその機構が非常に詳しく調べられている。酵母における鉄吸収は、まず細胞膜表面で三価鉄還元酵素FRE1、FRE2により三価鉄の二価鉄への還元を行う(Dancis et al., 1990, 1992, Georgatsou and Alexandraki, 1994)。還元された二価鉄を細胞内に取り込む手段として高親和性機構(high affinity)と、低親和性機構(low affinity)の2つの吸収機構がある。

【0007】

高親和性機構による鉄吸収は、マルチ銅酸化酵素(multicopper oxidase)FET3による二価鉄の再酸化(Askwith et al. 1994)を行った後、恐らくは三価鉄のトランスポーターFTR1(Stearman et al., 1996)で細胞内に取り込まれると考えられている。ここでFET3による二価鉄の再酸化には、銅が必要であることが分かっており(Dancis et al., 1994, Klomp et al., 1997)、FET3に銅を供給する経路についても調べられている(Yuan et al., 1995, Lin et al., 1997)。

一方、低親和性機構による鉄吸収は、二価鉄のトランスポーターであるFET

4 (Dix et al., 1994,1997) の働きによるものであると考えられている。

【0008】

酵母におけるこのような鉄吸収機構を植物に応用することにより、鉄欠乏土壌でも生育できる植物を創製することが可能となる。

本発明者らは、この目的で、Dr. Dancis (NIH) より提供を受けた酵母の FRE 1 遺伝子を、タバコへ導入した形質転換されたタバコを創製した (山口, 1995)。しかし、FRE 1 遺伝子の導入された形質転換タバコでは、その還元活性は野生型に比べ変化がみられなかった。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、酵母の遺伝子 FRE 1 はタバコではその転写産物が 0.9 kb と小さなものになっていた。

【0009】

このような異種生物の遺伝子を高等植物に導入しようとして転写が不完全だった例として、バチルス菌 (*Bacillus thuringiensis*) のデルターエンドトキシン (δ -endotoxin (殺虫性のタンパク質)) をコードする遺伝子群 Cry がある。42 以上の Cry 遺伝子が存在し、大別すると 4 つのクラス (cry I ~ cry IV) に分けられる (Whiteley and Schnepf, 1986)。この殺虫性タンパク質をコードする遺伝子が高等植物に導入されたが、うまく発現しなかったり、極端に発現量が落ちていたことがわかった。

この原因として、(1) コドン利用率 (codon usage) の違い、(2) Cry 遺伝子の AT 含量が高い、(3) mRNA の不安定性、(4) Cry 遺伝子の一部がイントロンとしてスプライシングされている、等があげられている。

Cry 遺伝子群を高等植物で効率的に発現させるために、植物に合う塩基配列にそれぞれ Cry 遺伝子を直し、プライマーを合成して PCR により完全合成することでタンパクの発現量の高い形質転換植物を作製したことも報告されている (Perlak et al., 1991, Fujimoto et al., 1993, Nayak et al., 1997)。

【0010】

このように、高等植物に他の生物の遺伝子などを導入して形質転換することは知られているが、その発現は必ずしも十分なものではなかった。その原因として前記したような種々のものが考えられていた。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、有用な高等植物に他の生物が有している機能を付加するために、当該機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を、高等植物に導入して形質転換された高等植物において、当該導入遺伝子が十分に発現するための要因を鋭意研究してきたところ、形質転換される植物の mRNA のポリ（A）付加に関する要素の塩基配列が発現に重要な部分であることを見出した。

したがって、本発明は、導入された遺伝子が形質転換された高等植物中で高効率で発現するための方法、当該形質転換された高等植物、及び、そのための遺伝子の改変方法を提供するものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明は、有用植物に他の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法において、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、当該他の遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される有用植物の mRNA のポリ（A）付加に関する要素の領域を、mRNA のポリ（A）付加に関係しないような他の塩基配列に改変することを特徴とする有用植物を形質転換する方法に関する。前記した mRNA のポリ（A）付加に関する要素の領域の塩基配列としては、AATAAA 様の塩基配列が好ましく、また、当該 mRNA のポリ（A）付加に関する要素の領域が、GT-リッチな塩基配列の下流側に存在している領域であることが好ましい。さらに、当該領域の塩基配列の改変は、形質転換される有用植物のコドン利用率に基づいて行われることが好ましい。

【0013】

本発明の方法においては、導入される遺伝子の塩基の G 及び T が豊富な領域が少ないこと、導入される遺伝子の全領域にわたって塩基の G 及び C の含有量の差が少ないこと、ATTTA 配列を有さないこと、及び／又は、導入される遺伝子の開始コドンの上流に、コザック配列（Kozak 配列）を有することが好ましい。

【0014】

また、本発明は、本発明の方法により製造され得る形質転換された有用植物に関する。本発明の形質転換された有用植物は、生体であっても、種子であってもよくその形態については制限はない。

さらに、本発明は、前記の形質転換する方法で使用され得る塩基配列が改変された塩基配列を有する核酸、特にDNAに関する。

【0015】

本発明の核酸の塩基配列は、形質転換された有用植物において高効率で発現できるように改変されたものであり、例えば、当該有用植物のmRNAのポリ(A)付加に関係する要素であり、当該ポリ(A)付加に関係する要素の部分を他の塩基配列で置換されていることを特徴とするものであり、さらには、導入される遺伝子の塩基のG及びTが豊富な領域が少ないこと、導入される遺伝子の全領域にわたって塩基のG及びCの含有量の差が少ないこと、ATTTA配列を有さないこと、及び／又は、導入される遺伝子の開始コドンの上流に、コザック配列(Kozak配列)を有することが好ましい。

【0016】

また、本発明は前記した核酸類を、数個のフラグメントに分割して、これらのフラグメントを結合させることを特徴とする前記の核酸類を製造する方法に関する。

【0017】

本発明の形質転換される有用植物としては、食品、医薬品などの産業上利用される植物であれば制限はないが、穀物、野菜、果実種、タバコなどの高等植物が好ましい。

また、本発明の導入される他の遺伝子としては、植物に対して有用なものであり、植物自体及びヒトに対して害を及ぼさないものであれば、特に制限はない。植物に対して直接的に有益なものであってもよいが、除草剤などの薬物に対する耐性を持たせるための遺伝子などであってもよいが、細菌、酵母などの生物由来の酵素などが好ましい。例えば、鉄の吸収に関与する酵母の三価鉄還元酵素FRE1などが好ましい。

【0018】

本発明者らは、形質転換された植物において、導入された遺伝子の発現を左右する要因として、mRNAのポリ(A)の付加を決定づけている塩基配列があることを見出した。さらに、このポリ(A)の付加を決定づけている塩基配列の上流にGT-リッチな塩基配列が必要であることを見出した。つまり、GT-リッチな塩基配列があると、植物ではポリ(A)の付加が決定され、その後でくるポリ(A)シグナル、例えば、AATAAA様の塩基配列の10～30b後ろの箇所でmRNAを切断し、ポリ(A)ポリメラーゼの働きでポリ(A)が付加するのである。したがって、導入される遺伝子がこのような塩基配列を有している場合には、形質転換された植物においては、全長のmRNAは発現することができず、AATAAA様の塩基配列を有するポリ(A)シグナルの10～30b後ろでmRNAが切断されることになる。

【0019】

したがって、本発明は導入される遺伝子中に存在する植物におけるポリ(A)シグナル、例えば、AATAAA様の塩基配列、好ましくはGT-リッチな塩基配列を他の塩基配列に改変することを特徴とするものである。

【0020】

改変のための塩基配列の設計方法としては、まず、導入される遺伝子がコードしているアミノ酸配列を変更しないようにコドンを選定する。アミノ酸配列は、その蛋白質が有する機能に実質的な影響を及ぼさないのであれば、これを変更することもできるが、アミノ酸配列は変更しないようにおこなうのが好ましい。

アミノ酸をコードするコドンが複数存在する場合には、形質転換される植物のコドンの利用率を考慮して、当該植物の利用率が高いコドンを選定することが好ましい。

【0021】

また、ポリ(A)シグナルの塩基配列の改変のみならず、GT-リッチな塩基配列を除くことも好ましい。特に、高度にGT-リッチな塩基配列が存在している場合には、その下流側に出現するポリ(A)シグナル様の塩基配列の領域でmRNAが切断される可能性が高いので、このような領域のGT含有量を減少させ

る改変が重要である。

【0022】

さらに、本発明の方法によれば、前記の改変に加えて導入される遺伝子の全領域にわたって塩基のG及びCの含有量の差が少なくなるように改変するのが好ましい。また、mRNAの不安定化配列として知られている、A T T T A配列を有さないこと、及び／又は、導入される遺伝子の開始コドンの上流に、真核生物でmRNAが効率よく翻訳されるための配列として知られているコザック配列（K o z a k配列）を有することが好ましい。

即ち、本発明の方法は、前記した塩基配列の改変に、さらに通常の改変方法を組み合わせて塩基配列を改変することも包含するものである。

【0023】

塩基配列を代える方法としては、とくに制限はなく公知の各種の方法で行うことができる。例えば、ポイントミューテーションや制限酵素により切断して改変することなどの任意の方法で行うことができる。

また、改変すべき塩基が多数になる場合や、導入する遺伝子自体が短い場合には、合成法により製造することもできる。後により具体的に説明するように、遺伝子が長い場合であっても、これらをいくつかのフラグメントに分割して、P C R法により製造された各フラグメントを、制限酵素を用いて結合させることにより、改変された塩基配列を有する遺伝子を製造することもできる。

【0024】

さらに、本発明の方法をより具体的に説明するが、本発明の方法が以下の説明で使用されるものに限定されるものでなく、以下の説明に基づいて広範囲な応用ができることは当業者には明らかである。

【0025】

本発明者らは、まず、タバコに導入した酵母のF R E 1のmRNAの長さが短くなっている（約0.9 kb）ことから、この原因を考察した。酵母の3価鉄還元酵素遺伝子F R E 1をタバコに導入した場合の転写産物が不完全な長さであった原因として、

（1）mRNAの一部がイントロンとして切り出されている。

(2) 転写領域 (coding region) の途中で転写が終わっている。

という2つの可能性が考えられた。さらなる解析を行うためRT-PCRを行い、FRE1を遺伝子導入した形質転換タバコでは転写領域 (coding region) の途中でポリ (A) の付加が起こっていることが判明した。

【0026】

実際にいままで酵母の遺伝子を高等植物に導入し発現が確認されている例としてインペルターゼ (Hincha, 1996) などがある。今回、FRE1遺伝子の導入により同じ真核生物の遺伝子であっても完全長のmRNAが合成されない場合があるという新規な知見を得ることができた。

FRE1を導入した形質転換タバコで完全長のmRNAができない理由は、FRE1の転写領域 (coding region) の途中でポリ (A) が付加しているためであった。

【0027】

ポリ (A) が付加する位置 (poly(A) site) は一ヶ所ではなく、それぞれのポリ (A) サイトの上流には確かに塩基配列がAAUAAA様のポリ (A) シグナルと推定される領域 (putative poly(A) signal) が存在した。しかし、AAUAAA様の配列というのは、FRE1の5'側にいくつか存在するが、これらの場所ではポリ (A) の付加は起こっていないことがわかった。

植物においてポリ (A) の付加を決定づけているのは、ポリ (A) シグナルのさらに上流に存在する、GU-リッチな配列の方ではないかと考えられた。つまりGU-リッチな配列があると植物ではポリ (A) の付加が決定され、その後でくるAAUAAA様の配列の10～30b後ろの「PyA」でmRNAを切断し、ポリ (A) ポリメラーゼの働きでポリ (A) が付加するのだろう。

結局、酵母ではポリ (A) の付加に無関係であったGU-リッチな配列が植物では、ポリ (A) の付加を決定していることが、FRE1を導入した形質転換タバコで完全長のmRNAができない原因であると考えられた。

【0028】

三価鉄還元酵素FRE1のGT-リッチであると思われる配列を図4に示す。図4の四角で囲った領域がGT-リッチであると考えられる領域である。

従って、タバコで三価鉄還元酵素 F R E 1 を発現させるためには、F R E 1 遺伝子の G T-リッチな配列を除けばいいと考えられる。しかし、現在までのところ植物のポリ (A) 付加を決定づける配列についてはコンセンサスが G U-リッチというぐらいで、配列がはっきりと特定されているわけではない。はっきりとしたコンセンサスがわからない以上、その配列を変えるだけでは完全長の m R N A を得られない可能性がある。植物において完全長の m R N A が合成されるように、F R E 1 のアミノ酸配列を変えずに、形質転換される植物のコドン利用率 (codon usage) にあわせた塩基配列を設計することにした。

【0029】

そこで、本発明者らは、タバコで酵母の三価鉄還元酵素を発現させるために、F R E 1 のアミノ酸配列を変えずにタバコのコドン利用率 (codon usage) にあった塩基配列に設計し直した。塩基配列の設計に当たって次ぎの点を考慮した。

【0030】

- (1) G T-リッチな領域除いた。
- (2) ポリ (A) シグナルとされる塩基配列 A A T A A A およびそれに似た塩基配列を除いた。
- (3) 塩基配列を確認しやすいように、約 400 b p ごとに制限酵素部位をつくり、5つのセグメントに分けた (417~436 b p)。
- (4) m R N A の不安定化配列といわれる塩基配列 A T T T A 配列 (Ohme-Takagi, 1993) をなくした。
- (5) 全領域にわたって塩基 G 及び C の含量に差がないようにコドンの位置を入れ換えた。
- (6) K o z a k 配列と呼ばれる真核生物で、m R N A が効率よく翻訳されるための配列 (Kozak, 1989) を開始コドンの前に付けた。

【0031】

このようにして設計された酵母の三価鉄還元酵素 F R E 1 の遺伝子の改変された塩基配列を、配列表の配列番号 1 に示す。また、配列番号 2 にそのアミノ酸配列を示す。

設計された遺伝子の名前は、再構築 F R E 1 (以下、reconstructed F R E 1

の略で「refrel」という。)とした。

【0032】

本発明のrefrelは、図5に示す5個のセグメント(A～E)に分けて合成された。

セグメントAは、434bpまでのもので、1塩基目からEcoRI、7塩基目からXbaI、429塩基目からBamHIの制限酵素サイトを持つように設計された。セグメントBは、429～845bpまでのもので、429塩基目からBamHI、840塩基目からMroIの制限酵素サイトを持つように設計された。セグメントCは、840～1275bpまでのもので、840塩基目からMroI、1270塩基目からSalIの制限酵素サイトを持つように設計された。セグメントDは、1270～1696bpまでのもので、1270塩基目からSalI、1691塩基目からPstIの制限酵素サイトを持つように設計された。セグメントEは、1691～2092bpまでのもので、1691塩基目からPstI、2081塩基目からSacI、2087塩基目からHindIIIの制限酵素サイトを持つように設計された。

【0033】

417～436bpの各セグメントA～Eは、それぞれ77～83merのプライマー6本を用いて合成した。使用したA-1～E-6までの30本のプライマーを図6に示す。また、これらの塩基配列を配列表の配列番号5～34に示す。

各セグメントのプライマーのうちの-1、-2、-3はセンス鎖であり、プライマー-4、-5、-6はアンチセンス鎖である。各セグメントのプライマー-3と-4が、3'末端に12か13bpの相補鎖、プライマー-1と-2、-2と-3、-4と-5、-5と-6がそれぞれ3'末端に12か13bのオーバーラップをもつようにプライマーを設定した。また、プライマー-1と-6は5'末端の1塩基目から制限酵素部位をもつように設定した。

これらのプライマーと、設計された塩基配列との関係を図7に示す。

各セグメントA～Eは、前記した塩基配列に従って合成されたプライマーを用いてPCR法により(図5参照)製造された。

【0034】

3段階目のPCRの反応液を0.8%アガロースゲルで電気泳動した後、予想される長さ(417~436bp)のバンドを切り出して精製し、プラスミドpT7Blue(R)ベクター(TaKaRa製)へクローニングした。得られたクローンの塩基配列を確認し、蛍光DNAsequencerDSQ-1000L(島津製)を利用して正しい塩基配列をもつものを選抜した。

それぞれの正しい配列をもつセグメントを得た後、制限酵素部位を利用して図8に示す方法によりrefre1の全長を作成した。

セグメントB及びEは、インサートの向きが全長の作成ために必要であった。他のセグメントについてはインサートの向きに関係なく正しい塩基配列を含んでいるものを使用した。

【0035】

得られたrefre1の全塩基配列を図9示す。refre1の配列の特徴としては、

- (1) 元のFRE1と75.3%のホモロジーがある。
(アミノ酸配列は100%)
- (2) 8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まない。
- (3) AATAAAという配列だけでなく、この中のどの1塩基を他の塩基で置換した配列も含まない。
- (4) ATTTA 配列を含まない。
- (5) 全領域にわたってGC含量に差がない。

等があげられる。

元のFRE1と比べて、refre1では連続したG及びTのみの配列が減っていることを図10に示す。これは、FRE1およびrefre1の配列中の連続した8塩基のGT含量を%で表したものである。図10に示したように、refre1では、GTの含有量が元のFRE1に比べて均一化されていることがわかる。

【0036】

このようにして合成した遺伝子refre1をタバコ(Nicotiana Tabacum

L.var. SR1) へ導入した。形質転換の結果カナマイシンに耐性な植物が68個体再生した。再生してきた植物に目的遺伝子である *ref re 1* が導入されていることと、そのコピー数を確認するためにゲノミック・サザン・ハイブリダイゼーションを行った。その結果形質転換体で1から数コピーの個体において *ref re 1* 遺伝子の存在が確認された。

【0037】

植物細胞への遺伝子導入から植物体を再生させるまでの方法は、通常の方法により行うことができる。例えば、「ラボマニユアル植物遺伝子の機能解析」(丸善)(参考文献(4))に記載の方法に準じて行うことができる。

より具体的には、前記の方法で *p T 7 B l u e* (R) ベクターにクローニングした *ref re 1* の制限酵素 *X b a I* と *S a c I* とのフラグメントを、バイナリーベクター *p B I 1 2 1* (TOYOBO製) の β -*g l u c r o n i d a s e* の ORF と定法により交換し、バイナリーベクター *p R F 1* を作成した。バイナリーベクター *p R F 1* の構造を図11に示す。

【0038】

得られたバイナリーベクター *p R F 1* を大腸菌に入れ、この大腸菌とヘルパープラスミド *p R K 2 0 1 3* (helper plasmid *p R K 2 0 1 3*) をもつ大腸菌とを、37℃で1晩振盪培養した。一方、アグロバクテリウムツメファシエンス C58 (*Agrobacterium tumefaciens* C58) を、適切な抗生物質を含む LB 液体培地 1 mL 中で 26℃で2晩振盪培養した。これらを、それぞれ 100 μ L をとり抗生物質を含まない LB プレート上に混合し、26℃で2晩培養した後、白金スパチュラでプレートをかきとり選択プレート (100 μ g/ μ L *rifampicin* (Rf) と 25 μ g/ μ L *kanamycin* (Km) を含む LB プレート) にて、26℃で2晩培養してシングルコロニーを形成させた。

シングルコロニーを 4 mL の LB (Km, Rf) 液体培地中、26℃で2晩振盪培養し、アルカリ-SDS法 (*a l k a l i n e - S D S* 法) で、プラスミドを抽出し制限酵素による切断パターンをみることで、*p R F 1* の存在を確認した。

【0039】

形質転換される植物は次のようにして用意された。

野生型のタバコの8cmほどの若い葉を2～3枚切り取り、滅菌液（次亜塩素酸10%、Tween20 0.1%）で満たしたシャーレに入れ、15分間攪拌しながら滅菌した。その後、滅菌水で3回ゆすいだ後、葉を8mm角にメスで切った。シャーレに集めておいた葉片に、LB（Km, Rf）液体培地中、26℃で二晩培養したバイナリーベクターpRF1をもつアグロバクテリウムツメファシエンスC58（*Agrobacterium tumefaciens* C58）の培養液を3mLを加えた。1分後パスツールピペットですばやく液を取り除き、さらにオートクレーブ滅菌した濾紙上で余分な液を取り除いた。

葉片を、MS培地にベンジルアデニン及びナフタレン酢酸を加えた培地上に置き、25℃で明るい条件で3日間培養した。その後、葉片を前記のMS培地にさらにクラフォラン（CLAFORAN）を加えた培地に移し1週間培養した後、前記のクラフォランを加えた培地にさらにカナマイシンを加えたMS培地に移し、2週間ごとに植え継いだ。カルスが誘導され、シュート（shoot）が形成されたらメスで当該シュート（shoot）を切り取り、MS培地にカナマイシンを加えた培地に移した。

シュート（shoot）から根が出たものをパーミキュライトに植えかえ、ハイポネックス（ハイポネックス ジャパン）を与えて育て形質転換された植物を得た。

【0040】

形質転換の結果、カナマイシンに耐性をもつ形質転換された植物を68個体得ることができた。これらの植物のうちの生育した例を図12、及び、開花しているものを図13に写真として示す。

そのうちの5個体についてゲノミックサザン・ハイブリダイゼーションを行った。その結果を図14に示す。

ゲノミックサザン・ハイブリダイゼーションは、形質転換されたタバコからのゲノムDNAの抽出は「植物細胞工学シリーズ2 植物のPCR実験プロトコル」（秀潤社）（参考文献（2））に従って行い、得られたゲノムDNAを、制限酵素EcoRI及びHindIIIをもちいて消化し、ref re 1の全長断

片を鋳型として作成したプローブ（ただし $[\alpha - ^{32}\text{P}] - \text{dATP}$ を用いた）を用いて行った。

【0041】

図14に示されゲノミックサザン・ハイブリダイゼーションでは制限酵素処理の時点でDNA量を揃えたが、制限酵素処理後エタノール沈殿を行ったために泳動量にばらつきがみられる。従ってここで検出されたバンドの濃さは必ずしも導入された遺伝子のコピー数を反映しているわけではない。

制限酵素 *EcoRI* 及び *HindIII* を用いた消化ではすべての個体で予想される、3.2 kbp の大きさにバンドが観察された。しかし、No. 12 の個体からは3.2 kbp よりもわずかに小さいバンドも検出された。この結果によれば、No. 1 と No. 11 には1コピー、No. 2 には3コピーか4コピー、No. 9 には4コピーの、*ref re 1* が存在していると考えられる。

なお、No. 12 の *HindIII* による消化はゲルへのロードミスのためバンドが検出されなかった。

【0042】

前記のゲノミックサザン・ハイブリダイゼーション解析の結果から、ここで選んだ5個体については、*ref re 1* 遺伝子が導入されていることがわかった。

制限酵素 *EcoRI* 及び *HindIII* で切り出すと、プロモーターからターミネータまでが切り出されるので、導入した *ref re 1* 遺伝子は *CaMV 35S* プロモーターの制御下で mRNA へと転写されることになる。No. 12 の *EcoRI* 及び *HindIII* の両者での消化において、3.2 kbp よりもわずかに小さいバンドも検出されたのは、おそらく導入されたコンストラクトのうちの1つが植物ゲノムに組み込まれる前に途中で切れてしまい、植物ゲノムの *EcoRI* か *HindIII* 部位の近くに入ったのだろうと考えられる。

【0043】

次に、前記のゲノミックサザン・ハイブリダイゼーションで *ref re 1* 遺伝子の導入が確認された形質転換されたタバコの No. 1 と No. 2 について、全長の mRNA ができていることをノーザン解析により確認した。

この解析における、ブロッティングの方法は定法、例えば、「クローニングと

シーケンス」(農村文化社)(参考文献(1))に従って行い、ハイブリダイゼーションの方法は前記のサザン解析の場合と同様に行った。

ノーザンハイブリダイゼーションの結果を図15に示す。図15では、野生型(W. T.)のレーンにはバンドは検出されなかった。No. 1とNo. 2のレーンには、2.5 kbの大きさにメジャーなバンドが検出され、それより小さな位置にいくつかのバンドが検出された。

【0044】

ノーザン解析により、本発明のrefrelの導入により完全長のmRNAができたかどうかを確認することができた。この解析は、本来は最も発現している根からの全RNAを抽出すべきことになるのではあるが、この試験では根を切断してしまうと次世代の植物を得ることができなくなってしまうので、葉からの抽出によって行った。プロモーターにCaMV35Sを用いたことから植物体全体でrefrel遺伝子が発現していることから、葉からの全RNAを抽出した前記の解析によっても、植物体の中なら葉でも根でも同じ様に転写が行われ、poly(A)の付加位置も変わらないことも確認できた。

【0045】

ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、refrelを導入したタバコでは2.5 kbの転写産物が確認されたので、poly(A)の付加は、NOSのターミネーターによって起こっていると考えられる。refrelを導入したタバコでは完全長のmRNAができていることがわかった。

図15にみられる、2.5 kbよりも小さなバンドは、泳動後に撮影した写真と比較するとちょうどrRNAの位置に検出されていた。rRNAへのプローブの非特異的な吸着かとも考えられたが、野生型のRNAにはハイブリダイズしていないことから、refrelの転写産物にハイブリダイズしていることは間違いない。refrelでも全長よりも短いmRNAがわずかながらできているという可能性はある。しかし完全にrRNAと同じ大きさに検出されたことから考えると、RNAの泳動時に、refrelのmRNAが大量に存在するrRNAに引きずられたのではないかと考えられる。poly(A)+RNAだけを精製してノーザンハイブリダイゼーションを行うことで、この理由は明らかにするこ

とができるが、図 15 から明なように大部分が完全長の mRNA であったのでその理由を追求する必要はなかった。

【0046】

また、このノーザンハイブリダイゼーションのために、サザンハイブリダイゼーションの結果、1 コピーであった No. 1 の形質転換体と、3 又は 4 コピーであった No. 2 の形質転換体の RNA を泳動したが、ref re 1 遺伝子のコピー数に従って、No. 2 の方がバンドが明らかに濃いことがわかった。

【0047】

さらに、得られた形質転換されたタバコ（カナマイシンで選抜）68 個体のうち、6 個体について根における恒常的な三価鉄還元活性を確認した。

還元活性の確認には、Fe (II) の強力なキレーターである、バソフェナンソロリン ジスルホン酸 (bathophenanthroline disulfonic acid (B P D S)) が Fe (II) と複合体を形成することで赤色を呈することを利用した。形質転換体と野生型のタバコのパーミキュライトを除いた後、根を B P D S を含有するゲルに寝かせアルミホイルで遮光して 27℃ で 24 時間静置した。形質転換体の根圏での発色から三価鉄の還元が確認された。

還元酵素活性の確認の写真を図 16 及び図 17 に写真で示す。図 16 及び 17 の写真は、カラー写真の白黒コピーであるために、B P D S との複合体による赤色が必ずしも明確ではないが、写真右側の形質転換体のほうが赤色に発色していることが黒く示されている。

【0048】

このように、根での三価鉄還元酵素活性の確認に用いた 6 個体 (kanamycin 選抜) はすべて三価鉄還元活性が検出された。形質転換されたタバコと野生型のタバコでの差を明確にするために還元酵素による反応時間を 24 時間と長く設定したが、1 時間ぐらいからその違いは確認された。実験に用いた形質転換体 6 個体すべてについて言えることだが、活性試験用のゲルにおくと野生型に比べて葉が萎れてしまうという傾向があった。これは、導入した ref re 1 遺伝子の葉での発現が、何らかのメカニズムで関与しているのではないかと推測される。このためあまり活性試験は行わなかったが、CaMV 35 S プロモーターの制御の下で

refrel 遺伝子が葉においても転写・翻訳され発現していることはまちがいない。

【0049】

このように、本発明者らは、酵母の三価鉄還元酵素FRE1を高等植物であるタバコで発現することができる新規なタバコを創製した。

異種生物の遺伝子の転写産物が完全長でないということが起こる原因として、mRNAの一部がイントロンとしてスプライシングされている可能性と、転写領域(coding region)の途中でポリ(A)が付加しているという2つの可能性が考えられる。

本発明は、異種生物の遺伝子を高等植物に導入して、完全長の転写産物が得られるための塩基配列の設計方法を提供するものである。本発明の方法は、転写領域(coding region)の途中で、ポリ(A)の付加を避けるために、8塩基以上連続したG又はTのみの配列を含まず、AATAAAという配列だけでなく、この中のどの1塩基を他の塩基で置換した配列(即ち、NATAAA、ANTAAA、AANAAA、AATNAA、AATANA、又は、AATAAN)も含まないように設計する必要があることが判明した。

また、G及びCの含量が全領域にわたって一定になるように設計することも重要であることがわかった。

【0050】

さらに、前記の発明の具体的な説明においては、プロモーターとしてCaMV35Sを用いたので形質転換されたタバコでは、植物体全体で三価鉄還元酵素が発現した。このように、プロモーターとの組合せにより、局所的に発現している遺伝子を植物全体で発現させることもできるようになる。また、反対に植物全体で発現している遺伝子を局所的に発現させることも、適当なプロモーターとの組合せにおいて可能となる。

【0051】

また、三価鉄を還元して吸収する機構はイネ科を除く単子葉と双子葉植物の鉄獲得機構に特徴的だが、イネ科でも鉄が十分に存在する状態では三価鉄を二価鉄に還元して吸収しているのではないかと考えられている。鉄欠乏の根で特異的に

働くプロモーターに、本発明の三価鉄還元酵素遺伝子 *ref r e l* をつなぐことにより、鉄欠乏条件下で鉄の吸収機構 (I) と吸収機構 (II) とを機能させることのできる新規なイネ科植物の創製も考えられる。

【0052】

以下に、本発明の参考文献を掲載する。

- (1) クローニングとシーケンス (1989) 農村文化社
- (2) 植物のPCR実験プロトコール (1995) 秀潤社
- (3) バイオ実験 イラストレイテッド・遺伝子解析の基礎 (1995) 秀潤社
- (4) ラボマニュアル植物遺伝子の機能解析 (1992) 丸善
- (5) アスキウイズら、セル、76巻、403-410頁 (1994年)
(Askwith, C., et al., Cell, 76:403-410 (1994))
- (6) ブラウンら、ソイルサイエンス、91巻、127-132頁 (1961年)
(Brown, J.C., et al., Soil Sci., 91: 127-132 (1961))

【0053】

- (7) チャネイら、プラントフィジオロジ、50巻、208-213頁 (1972年)
(Chaney, R.L., et al., Plant Physiol. 50: 208-213 (1972))
- (8) ダンシスら、モレキュラーセルバイオロジ、10巻、2294-2301頁 (1990年)
(Dancis, A., et al., Mol. Cell. Biol. 10: 2294-2301 (1990))

【0054】

- (9) ダンシスら、プロシーディングナショナルアカデミックサイエンス USA、89巻、3869-3873頁 (1992年)
(Dancis, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3869-3873 (1992))
- (10) ディックスら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー、269巻、26092-26099頁 (1994年)
(Dix, D.R., et al., J. Biol. Chem. 269: 26092-26099 (1994))

【0055】

- (11) ディックスら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー、272巻

- 、 11770-11777頁(1997年) (Dix, D., et al., J. Biol. Chem. 272: 11770-11777 (1997))
 - (12) エイデら、プロシーディングナショナルアカデミックサイエンス US A、93巻、5624-5628頁(1996年) (Eide, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5624-5628 (1996))
 - (13) フジモトラ、バイオ/テクノロジー、11巻、1151-1155頁(1993年) (Fujimoto, H., et al., Bio/Technology 11: 1151-1155 (1993))
- 【0056】
- (14) ガリーら、プラントセル、9巻、667-673頁(1997年) (Gallie, D.R., et al., Plant Cell 9: 667-673 (1997))
 - (15) ジョーガトソら、モレキュラーセルバイオロジー、14巻、3065-3073頁(1994年) (Georgatsou, E. et al., Mol. Cell. Biol. 14: 3065-3073 (1994))
 - (16) グオら、バイオケミカルサイエンス、21巻、477-481頁(1996年) (Guo, Z. et al., Biochem. Sci. 21: 477-481 (1996))
- 【0057】
- (17) ハセットら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー、270巻、128-134頁(1995年) (Hassett, R. et al., J. Biol. Chem. 270: 128-134 (1995))
 - (18) ヘザーら、ジャーナルオブプラントニュートリアス、7巻、667-676頁(1984年) (Hether, N.H., et al., J. Plant Nutr. 7: 667-676 (1984))
 - (19) ハインカら、ジャーナルオブプラントフィジオロジー、147巻、604-610頁(1996年) (Hinch, D.K., et al., J. Plant Physiol. 147: 604-610 (1996))
- 【0058】
- (20) コザック、ジャーナルオブセルバイオロジー、108巻、229-241頁(1989年) (Kozak, M., J. Cell. Biol. 108: 229-241 (1989))

(21) リンら、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー、272巻、9215-9220頁(1997年) (Lin, S.J., et al., J. Biol. Chem. 272: 9215-9220 (1997))

(22) マーシェナーら、ジャーナルオブプラントニュートリアス、9巻、695-713頁(1986年) (Marschner, H., et al., J. Plant Nutr. 9: 695-713 (1986))

(23) メウエスら、ネイチャー、387巻、7-8頁(1997年) (Mewes, H.W., et al., Nature 387: 7-8 (1997))

【0059】

(24) モリら、「根圏における微量金属栄養素の生化学」、第225-249頁(1994年) (Mori, S. (1994) Biochemistry of metal micronutrients in the rizosphere. (Eds. Manthey, J.A., Crowley, D.E., Luster, D.G., Lewis Publishers) pp.225-249)

(25) ナイトーら、プラントモレキュラーバイオロジー、11巻、109-124頁(1988年) (Naito, S., et al., Plant mol.Biol. 11:109-124 (1988))

【0060】

(26) ナカニシら、プラントセルフィジオロジー、34巻、401-410頁(1993年) (Nakanishi, H., et al., Plant Cell Physiol. 34: 401-410 (1993))

(27) ナヤックら、プロシーディングナショナルアカデミックサイエンス USA、94巻、2111-2116頁(1997年) (Nayak, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2111-2116 (1997))

【0061】

(28) オーメータカギら、プロシーディングナショナルアカデミックサイエンス USA、90巻、11811-11815頁(1993年) (Ohme-Tagaki, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11811-11815 (1993))

(29) オクムラら、ジャーナルオブプラントニュートリアス、15巻、215

7-2172頁(1992年) (Okumura, N., et al., J. Plant Nutr. 15: 2157-2172 (1992))

(30) オクムラら、プラントモレキュラーバイオロジー、25巻、705-719頁(1994年) (Okumura, N., et al., Plant Mol. Biol. 25: 705-719 (1994))

【0062】

(31) オルセンら、ジャーナルオブプラントニュートリアス、2巻、629-660頁(1980年) (Olsen, R.A. et al., J. Plant Nutr. 2: 629-660 (1980))

(32) パーラックら、プロシーディングナショナルアカデミックサイエンス USA、88巻、3324-3328頁(1991年) (Perlak, F.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3324-3328 (1991))

(33) スティアマンら、サイエンス、271巻、1552-1557頁(1996年) (Stearman, R., et al., Science 271: 1552-1557 (1996))

【0063】

(34) タカギ、ソイルサイエンスプラントニュートリアス、22巻、423-433頁(1976年) (Takagi, S., Soil Sci. Plant Nutr. 22: 423-433 (1976))

(35) タカギら、ジャーナルオブプラントニュートリアス、7巻、629-660頁(1984年) (Takagi, S., et al., J. Plant Nutr. 7: 469-477 (1984))

(36) ホワイトレーら、アヌアルレビューマイクロバイオロジー、40巻、549-576頁(1986年) (Whiteley, H.R., et al., Annu. Rev. Microbiol. 40: 549-576 (1986))

【0064】

(37) ウーら、プラントジャーナル、8巻、323-329頁(1995年) (Wu, L., et al., Plant J. 8:323-329 (1995))

(38) ヤーンら、プロシーディングナショナルアカデミックサイエンス USA、92巻、2632-2636頁(1995年) (Yuan, D.S., et al.,

Proc.Natl. Acad. Sci. USA 92: 2632-2636 (1995))

【0065】

【実施例】

つぎに実施例により、本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0066】

以下の実施例においては、基本的な遺伝子操作は「クローニングとシーケンス」（農村文化社）に従い、遺伝子の塩基配列の解析には DNASIS (Hitachi製) を使用した。

実施例 1 (FRE 1 を導入した形質転換タバコからの全 RNA の抽出)

FRE 1 を導入した形質転換タバコからの全 RNA の抽出は (Naito et al. 1988) に従って行った。

FRE 1 を導入した形質転換タバコの葉 2 g を乳鉢に入れ、液体窒素を加えて完全にすりつぶした。破砕物に 3 倍量の抽出用緩衝液と等量のフェノール/クロロホルム (1 : 1) を加え懸濁し、8000 rpm で 15 分遠心した後、水層を別のチューブに移し、さらに 2 回フェノール/クロロホルム抽出をし、その後クロロホルム抽出を 1 回行った。−80℃で 30 分間エタノール沈殿し、8000 rpm、4℃で 30 分遠心し沈殿を 70% エタノールで洗浄後、減圧乾燥した。沈殿を 1 mL の DEPC 水に溶かし、13500 rpm で 3 分遠心して上清を新しいチューブに移し、1/4 vol. の 10M LiCl を加えて氷上で 2 時間静置した。12000 rpm、4℃で 10 分遠心し、沈殿を 70% エタノールで洗浄後、減圧乾燥したものを DEPC 水 50 μL に溶かした。

【0067】

試薬 抽出用緩衝液

1 M Tris · HCl pH9.0

1% SDS

(使用前に 6 mL に対して 120 μL の β-メルカプトエタノールを加える。)

【0068】

実施例 2 (ポリ (A) + RNA の精製と cDNA の合成)

実施例1で得た禿RNAの100 μ gから、ダイナビーズオリゴ (Dyna beads Oligo) (dT) 25 (DYNAL製) を利用して、ポリ (A) + RNAを精製した。このポリ (A) + RNAを下記のハイブリッドプライマーを用いて、37℃で1時間 M-MLVリバーストランスクリプターゼ (M-MLV reverse transcriptase) (TOYOBO製) により逆転写反応を行いcDNAを得た。

ハイブリッドプライマー (dT₁₇アダプタープライマー)

5' -GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT
TTT-3'

【0069】

実施例3 (RT-PCRと塩基配列の確認)

実施例2で得られたcDNAを鋳型としてハイブリッドプライマーに特異的なプライマーと、FRE1の5' プライマーで、PCRを行った。

PCRの反応産物を0.8% アガロースで電気泳動し、得られたバンドをpT7Blue (R) ベクター (Takara製) ヘクローニングした。コロニーをLB培地で1晩振盪培養し、アルカリ-SDS法でプラスミドを抽出し、制限酵素処理によりインサートが入っていることが確認された7つのクローンの塩基配列をブカベストDNAポリメラーゼ (Bca BEST DNA polymerase) を用いて決定した。(「バイオ実験 イラストレイテッド・遺伝子解析の基礎」)(秀潤社)。

ハイブリッドプライマーに特異的なプライマー

5' -GACTCGAGTCGACATCG-3'

FRE1の5' プライマー

5' -ACACTTATTAGCACTTCATGTATT-3'

【0070】

PCRの反応条件

(1) 95℃ 5分

(2) 95℃ 40秒

(3) 55℃ 30秒

(4) 72℃ 1分

(5) 72℃ 10分

(6) 4℃

で、(2)、(3)、及び、(4)を40回繰り返した。

【0071】

この結果、FRE1を導入した形質転換タバコでは、FRE1遺伝子から転写されたmRNAには、図3に示すような位置でポリ(A)が付加していた。

ポリ(A)の付加位置は一様ではなく、いくつかの長さのmRNAが存在した。ポリ(A)サイト(poly(A) site)の上流のポリ(A)シグナル(poly(A) signal)として認識されていると思われる配列を推定されるポリ(A)シグナル(putative poly(A) signal)として示した。

【0072】

実施例4 (PCR法による各セグメントの製造)

各セグメントは、図5に示される、PCR法により製造した。タックポリメラーゼ(Taq polymerase)はスーパータック(super Taq)(サワディー製)を使用した。

PCR反応液の組成は、次のとおりである。

第1段階のPCR反応液

10x緩衝液	10 μ L
2 mM dNTP混合物	10 μ L
20 μ M プライマー(-3)	5 μ L
20 μ M プライマー(-4)	5 μ L
蒸留水 で 全量を	99.5 μ L

第2段階のPCR反応液

第1段階のPCR反応混合物	1 μ L
10x緩衝液	10 μ L
2 mM dNTP混合物	10 μ L
20 μ M プライマー(-2)	5 μ L
20 μ M プライマー(-5)	5 μ L

蒸留水 で 全量を 99.5 μ L

第3段階のPCR反応液

第2段階のPCR反応混合物 1 μ L

10 \times 緩衝液 10 μ L

2 mM dNTP混合物 10 μ L

20 μ M プライマー (-1) 5 μ L

20 μ M プライマー (-6) 5 μ L

蒸留水 で 全量を 99.5 μ L

【0073】

PCRの反応条件

- (1) 95℃ 5分
- (2) タック 0.5 μ L 添加
- (3) 95℃ 40秒
- (4) 45℃ 1分
- (5) 72℃ 1分
- (6) 94℃ 40秒
- (7) 60℃ 30秒
- (8) 72℃ 1分
- (9) 72℃ 10分
- (10) 4℃

で、(3)、(4)、及び、(5)を5回、(6)、(7)、及び、(8)を20回繰り返した。

【0074】

実施例5 (クローニングと塩基配列の確認)

実施例4の第3段階目のPCRの反応液を、0.8%アガロースゲルで電気泳動した後、予想される長さ(417~436 bp)のバンドを切り出して精製し、プラスミド pT7Blue (R) ベクター (Takara製) へクローニングした。得られたクローンの塩基配列を確認し、SHIMADZU 蛍光 DNA sequencer DSQ-1000Lを利用して正しい塩基配列をもつもの

を選抜した。

それぞれの正しい配列をもつセグメントを得た後、制限酵素部位を利用して図8のように *ref re 1* の全長を作成した。セグメントB、Eは、インサートの向きが全長の作成ために必要であった。他のセグメントについてはインサートの向きに関係なく正しい塩基配列を含んでいるものを使用した。

合成した *ref re 1* の全塩基配列を、配列表の配列番号1及び図9に示す。

【0075】

実施例6 (*ref re 1* のタバコへの導入)

実施例5により合成した遺伝子 *ref re 1* を、タバコ (*Nicotiana Tabacum* L. var. SR1) へ導入した。形質転換の結果、カナマイシンに耐性な植物が68個体再生した。再生してきた植物に目的遺伝子である *ref re 1* が導入されていることと、そのコピー数を確認するためにゲノミック・サザン・ハイブリダイゼーションを行った。その結果、1コピーから数コピーの *ref re 1* 遺伝子の存在が確認された。

植物細胞への遺伝子導入から植物体を再生させるまでの方法は、「ラボマニユアル植物遺伝子の機能解析」(丸善)に従って行われた。

【0076】

(1) 形質転換用バイナリーベクター *pRF1* の作成

pT7Blue (R) ベクターにクローニングした *ref re 1* の *Xba I* と *Sac I* フラグメントを、TOYOBOから市販されているバイナリーベクター *pBI121* の β -グルクロニダーゼ (β -glucuronidase) のORFと交換して、バイナリーベクター *pRF1* を作成した。バイナリーベクター *pRF1* の構造を図11に示す。

【0077】

(2) (バイナリーベクター *pRF1* のアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) への導入)

適切な抗生物質を含むLB液体培地1mL中で、アグロバクテリウムツメファシエンスC58 (*Agrobacterium tumefaciens* C58) を26℃で2晩振盪培養、*pRF1* をもつ大腸菌とヘルパープラスミド (helper plasmid) *pRK201*

3をもつ大腸菌を37℃で1晩振盪培養した後、それぞれ100μLをとり抗生物質を含まないLBプレート上に混合した。26℃で2晩培養した後、白金耳でプレートをかきとり選択プレート(100μg/μLリファンピシン(rifampicin)(Rf)と25μg/μLカナマイシン(kanamycin)(Km)を含むLBプレート)に、シングルコロニーを形成させた(26℃で2晩培養)。

得られたシングルコロニーを4mLのLB(Km, Rf)液体培地中、26℃で2晩振盪培養し、アルカリー-SDS法でプラスミドを抽出し、制限酵素による切断パターンをみることで、pRF1の存在を確認した。

【0078】

(3) (アグロバクテリウム(Agrobacterium)のタバコへの感染と植物体の再生)

野生型の8cmほどタバコ(Nicotiana Tabacum L. var. SR1)の若い葉を2〜3枚切り取り、滅菌液(次亜塩素酸10%, Tween20 0.1%)で満たしたシャーレに入れ、15分間攪拌しながら滅菌した。その後滅菌水で3回ゆすいだ後、葉を8mm角にメスで切った。シャーレに集めておいた葉片に、LB(Km, Rf)液体培地中、26℃で2晩培養したバイナリーベクターpRF1をもつアグロバクテリウム(Agrobacterium)の培養液を3mLを加えた。

1分後、パスツールピペットですばやく液を取り除き、さらにオートクレーブ滅菌した濾紙上で余分な液を取り除いた。葉片を下記のMS培地(II)上に置き、25℃で明条件で3日間培養した。その後葉片をMS培地(III)に移し1週間培養した後、MS培地(IV)に移し2週間ごとに植え継いだ。カルスが誘導され、シュート(shoot)が形成されたらメスでシュート(shoot)を切り取りMS培地(V)に移した。シュート(shoot)から根が出たものをバームキュライトに植えかえ、ハイポネックス(ハイポネックス ジャパン)を与えて育て再生植物を得た。

【0079】

前記の実験で使したタバコ用MS培地の組成は次のとおりである。

主要な成分(Major elements)(g/L)

NH_4NO_3 1.65

KNO_3	1.9
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.44
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.37
KH_2PO_4	0.17
少量の成分 (Minor element) (mg/L)	
H_3BO_4	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fe (III)Na-EDTA	0.042 mg/L
ミオイノシトール	100 mg/L
チアミン	5 mg/L
sucrose	30 g/L
ゲランガム	2 g/L

【0080】

MS培地 (I) は、前記の組成で作製、これに下記の植物ホルモン及び／又は抗生物質を加えて下記の他のMS培地を作った。

植物ホルモン	ベンジルアデニン (BA)	1.0 mg/L
	ナフタレン酢酸 (NAA)	0.1 mg/L
抗生物質	カナマイシン (kanamycin)	100 mg/L
	クラフォラン (claforan)	200 mg/L
MS培地 (II)	MS培地 (I) + BA + NAA	
MS培地 (III)	MS培地 (I) + BA + NAA + クラフォラン	
MS培地 (IV)	MS培地 (I) + BA + NAA + クラフォラン + カナマイシン	
MS培地 (V)	MS培地 (I) + カナマイシン	

【0081】

実施例 7 (サザン解析)

(1) タバコからのゲノムDNAの抽出

タバコからのゲノムDNAの抽出は「植物細胞工学シリーズ・植物のPCR実験プロトコール」(秀潤社)に従った。

乳鉢に、0.1~0.2gの葉を入れ、液体窒素を加えて完全にすりつぶした。破碎物をエッペンドルフチューブに入れ、300 μ Lの2%CTAB溶液を加え、混合し、65℃で30分間加温した。等量のクロロホルム・イソアミルアルコール(24:1)を加え5分間混合した。

12000rpmで15分間遠心し、上層を新しいチューブに移し、クロロホルム・イソアミルアルコール抽出をもう一度繰り返し、上層を新しいチューブに移した。1~1.5容量の1%CTAB溶液を加え、混合し、室温で1時間静置した後、8000rpmで10分間遠心した。上清を捨て400 μ Lの1MCSClを加え、65℃で沈殿が完全に溶けるまで加温した。800 μ Lの100%エタノールを加え、混合し、-20℃で20分間静置後、12000rpmで5分間遠心した。上清を捨て、70%エタノールで洗浄後、減圧乾燥したものを30 μ LのTE緩衝液に溶かした。

【0082】

試薬 2% CTAB溶液

100mM トリス-HCl (pH 8.0)

20mM EDTA (pH 8.0)

1.4M NaCl

2% CTAB (cetyltrimethylammonium bromide

)

1% CTAB溶液

50mM トリス-HCl (pH 8.0)

20mM EDTA (pH 8.0)

1% CTAB

【0083】

(2) 制限酵素によるゲノムDNAの切断と電気泳動

制限酵素処理は、pCaMV35SからtNOSまでが切断されるEcoRI及びHindIIIの両者による消化と、pCaMV35Sの上流で切断されるHindIIIだけの消化を行った。

ゲノムDNA10 μ gを、反応液量100 μ Lとして終夜で制限酵素処理し、エタノール沈殿して20 μ LのTE緩衝液に溶解した。loading buffer 2 μ Lを加えて0.8%アガロースゲルで、60Vで5時間、電気泳動した。泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、UVトランスイルミネーター上でスケールとともに写真を撮影した。

【0084】

(3) ブロットイングとハイブリダイゼーション

写真撮影後のゲルを蒸留水で洗浄し、0.2N HCl中で10分間振盪した。ブロットイングの方法は「クローニングとシーケンス」(農村文化社)に従った。0.4N NaOHでナイロンメンブレン(New Hybond-N+, Amersham)にトランスファーし、2xSSPEで5分洗った後室温で3時間乾燥した。ハイブリダイゼーションの方法は「バイオ実験イラストレイテッド・遺伝子解析の基礎」(秀潤社)を参照した。メンブレンをあらかじめ65℃に加温しておいた30mLのハイブリダイゼーションバッファーでプレハイブリダイゼーションを65℃で1時間行い、ハイブリダイゼーションバッファーを交換(25mL)した。プローブを加え、65℃で12時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンの洗浄はあらかじめ65℃に加温しておいた洗浄液で65℃10分を2回、high stringent洗浄液で、65℃10分を1回行った。メンブレンをサランラップでつつみ、イメージングプレートに24時間感光させ、イメージアナライザー(Fuji Film製)で結果を確認した。

【0085】

試薬

20xSSPE

3 M NaCl
0.2 M NaH₂PO₄
1 mM EDTA

1 M チャーチ・リン酸バッファー

800 ml 程度の蒸留水に、NaHPO₄ 0.5 mol
を 加え、H₃PO₄でpHを7.2に合わせた後、蒸留水で1
L にし、オートクレーブ

ハイブリダイゼーションバッファー

0.5 M チャーチ・リン酸バッファー
1 mM EDTA
7 % SDS (v/v)

使用前に、denatured salmon sperm (1 mg/ml) を
1/100 vol. 加える

洗浄液

40 mM チャーチ・リン酸バッファー
1 % SDS (v/v)

high stringent 洗浄液

0.2 x SSPE
0.1 % SDS (v/v)

【0086】

(4) プロープの作成

refrelの全長断片を鋳型として、ランダムプライマーDNAラベリング
キット第2版 (Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2.0) (Takara製)
を用いてプロープを作成 (ただし [α -³²P] - dATPを用いた。) し、Pr
obeQuantTM G-50 Micro Columns (Pharm
acia Biotech製) により未反応の [α -³²P] - dATPを除去し
た。

結果を図14に示す。図14の左側は、制限酵素EcoRI及びHindIII
Iの両者による消化を行ったものであり、右側は、HindIIIだけの消化

を行ったものである。図中のW. T. は野生型を示す。

【0087】

実施例 8 (ノーザン解析)

(1) 全RNAの抽出

実施例 1 と同様な方法により、r e f r e 1 を遺伝子導入した形質転換タバコおよび野生型のタバコの葉から、全RNAを抽出した。

【0088】

(2) RNAの電気泳動

泳動槽・ゲル受け・コームおよび三角フラスコはあらかじめ アブソルブ (a b S o l v e (R N a s e 阻害剤 D U P O N T 製)) 処理をしておいた。20xMOPS 10 mL、2.4 g アガロース、100 mL 滅菌蒸留水を三角フラスコにいれ、電子レンジでアガロースを溶かした。約 50℃ まで冷えたところで、ホルムアルデヒド 10 mL を加え、滅菌蒸留水で 200 mL にしたものを固めてゲルに用いた。泳動槽に、約 800 mL の 1xMOPS を入れ、10 mg/mL のエチジウムブロマイド 5 μ L を加え、泳動緩衝液とした。全RNA 10 μ g に 16 μ L の RNA s a m p l e b u f f e r を加え、滅菌蒸留水で 20 μ L とし、65℃ で 10 分間加温した後氷上で 5 分間静置したものを泳動した。泳動条件は、60 V で 1 時間泳動した後、電圧を 120 V にしてさらに 2 時間泳動した。

【0089】

試薬

20xMOPS

0.4 M	MOPS
0.1 M	NaOAc
0.02 M	EDTA

RNA s a m p l e b u f f e r

ホルムアルデヒド	1.6	mL
ホルムアミド	5.0	mL
20xMOPS	0.5	mL

グリセリン色素液	1.6 mL
合 計	8.7 mL

【0090】

グリセリン色素液

グリセリン	5 mL
ブロモフェノールブルー	1 mg
キシレンシアノール	1 mg
0.5MEDTA (pH8.0)	0.02 mL

【0091】

(3) ブロットイングとハイブリダイゼーション

泳動終了後、ゲルを UV イルミネーターにのせスケールと共に写真を撮った。ブロットイングの方法は「クローニングとシークエンス」(農村文化社)に従い、20×SSPEで、RNAをゲルからナイロンメンブレン(New Hybond-N Amersham)にトランスファーした。12時間後、メンブレンを、2×SSPEで5分間洗い、3時間室温で乾燥した後5分間UV照射してメンブレンにRNAを固定した。

ハイブリダイゼーションの方法はサザン解析の場合と同様に行った。

結果を図15に示す。図中のW. T. は野生型を示す。野生型(W. T.)のレーンにはバンドは検出されなかった。No. 1とNo. 2のレーンには2.5 kbの大きさにメジャーなバンドが検出され、それより小さな位置にいくつかのバンドが検出された。

【0092】

実施例9 (三価鉄還元酵素活性の確認)

refrelを遺伝子導入した形質転換体と野生型のタバコを、バーミキュライトに植え替えハイポネックス(Hyponex)を与えて育て、シュート(shoot)が5cm~10cm位になったものを用いて三価鉄還元酵素活性を確認した。

三価鉄還元酵素活性の確認には、Fe(II)の強力なキレーターであるバソフェナンソロリンジスルホン酸(bathophenanthroline di

sulfonic acid (BPDS)) が、Fe (II) と複合体を形成することで赤色を呈することを利用した。分析用緩衝液 (assay buffer) にアガロースを0.4%になるように加え、電子レンジで溶解後、ある程度冷えてから1/100 vol. の500 μ M Fe (III) - EDTA と1/100 vol. の500 μ M BPDSを加え、攪拌し容器に入れ、固まるまで待った。形質転換体と野生型のタバコのパーミキュライトを除いた後、根をゲルに寝かせアルミホイルで遮光して27℃で24時間静置した。

同様の実験を再生植物の種子から発芽させた2世代目の形質転換植物で行った。このときの反応時間は1時間とした。

【0093】

分析用緩衝液 (assay buffer)

0.2 mM CaSO_4

5.0 mM MES buffer pH 5.5

【0094】

三価鉄還元酵素活性の確認の写真を図16及び図17に、2世代目の三価鉄還元酵素活性の確認の写真を図18に示した。形質転換体の根圏での発色から三価鉄の還元が確認された。

【0095】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 2092

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 両形態

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : modified base

配列 :

GAATTCTCTA GACTCCACCA TGGTTAGAAC CAGAGTCCTT TTCTGCCTCT TCATCTCTTT 60

CTTCGCTACA GTCCAATCGA GCGCTACACT CATCTCCACT TCATGCATTT CTCAGGCTGC 120

ACTGTACCAG TTCGGATGCT CAAGCAAGTC AAAGTCTTGC TACTGCAAGA ACATCAATTG 180

GCTCGGAAGC GTCAGTGCAT GCGCTTATGA GAACTCCAAA TCTAACAAGA CTCTGGACTC 240

CGCTTTGATG AAAGTTGCCA GCCAATGCTC AAGTATCAAG GTTTACACAC TGGAGGACAT 300

GAAGAACATC TACCTTAATG CAAGTAACTA CCTTCGCGCT CCTGAGAAAT CCGATAAGAA 360

GACAGTTGTT TCACAACCGT TGATGGCAAA TGAGACGGCC TATCACTACT ACTATGAGGA 420

AAACTATGGG ATCCACTTGA ATTTGATGCG ATCTCAATGG TCGCATGGG GCCTCGTCTT 480

CTTCTGGGTC GCAGTCCTTA CCGCCGCAAC TATCTTGAAC ATTCTCAAAC GCGTATTCGG 540

CAAGAACATT ATGGCAAATT CTGTAAAGAA GTCTCTTATC TACCCAAGCG TTTACAAAGA 600
 CTACAACGAG AGAACTTTCT ATCTTTGGAA ACGTTTGCCA TTCAACTTTA CAACTCGAGG 660
 CAAAGGACTC GTAGTTCTTA TCTTTGTCAT TCTGACTATT CTCTCACTCT CTTTCGGACA 720
 TAACATCAAG TTGCCACATC CTTACGATAG ACCTAGATGG AGAAGATCAA TGGCATTTCGT 780
 CTCACGCCGT GCTGACTTGA TGGCAATCGC TCTTTTCCCC GTGGTGTACC TTTTCGGTAT 840
 CCGGAACAAC CCCTTCATCC CAATCACCGG ATTGAGCTTT AGTACTTTCA ACTTTTACCA 900
 CAAATGGTCA GCATACGTCT GCTTCATGTT AGCCGTCGTC CATTCAATCG TTATGACCGC 960
 TTCAGGAGTT AAACGAGGAG TATTCCAGTC TCTTGTAAGG AAATTCTACT TCAGATGGGG 1020
 AATAGTAGCC ACAATTCTTA TGTCCATCAT CATTTTCCAG TCCGAGAAGG TCTTCAGGAA 1080
 CCGAGGTTAT GAAATCTTCT TACTTATTCA CAAAGCCATG AACATCATGT TTATCATAGC 1140
 TATGTATTAC CATTGCCACA CACTAGGATG GATGGGCTGG ATCTGGTCCA TGGCTGGCAT 1200
 CCTCTGCTTC GACAGGTCTT GCCGAATTGT ACGTATCATC ATGAACGGAG GTCTTAAGAC 1260
 CGCCACTTTG TCGACCACAG ATGATTCTAA CGTTATCAAG ATCTCTGTCA AGAAGCCTAA 1320
 GTTCTTCAAG TATCAAGTGG GAGCATTTCG CTATATGTAC TTTCTTTCAC CAAAATCAGC 1380

CTGGTTCTAC AGTTTTCAAT CTCATCCCTT CACAGTCCTA TCAGAAAGGC ACAGAGATCC 1440

TAACAACCCA GATCAACTAA CTATGTACGT CAAAGCTAAC AAGGGCATTG CGAGAGTACT 1500

TCTTAGCAAA GTTCTAAGCG CTCCAAACCA TACCGTTGAT TGCAAGATTT TCTTAGAGGG 1560

ACCATATGGC GTAAGTGTCC CTCACATTGC CAAACTTAAG AGAAATCTAG TAGGAGTAGC 1620

TGCGGGCCTC GCGGTGGCAG CCATCTACCC CCATTTCGTA GAATGCCTTA GATTGCCTAG 1680

CACTGATCAA CTGCAGCACA AGTTCTACTG GATCGTCAAC GACCTTAGTC ACCTTAAGTG 1740

GTTCGAAAAC GAGCTACAAT GGCTTAAGGA GAAATCTTGT GAAGTCTCTG TCATCTACAC 1800

TGGGTCATCA GTGGAGGATA CAAACTCAGA TGAGTCCACT AAGGGTTTCG ATGACAAGGA 1860

AGAATCTGAA ATCACCGTAG AATGCCTTAA CAAGAGGCCA GACCTCAAAG AGCTAGTGAG 1920

ATCAGAGATC AAATTGTCAG AACTCGAGAA CAACAACATC ACTTTCTACT CATGCGGACC 1980

AGCGACTTTC AATGACGACT TTAGGAATGC AGTTGTACAA GGTATCGATT CTAGTCTGAA 2040

GATAGATGTC GAACTAGAGG AGGAGAGTTT TACTTGGTAA GAGCTCAAGC TT 2092

配列番号 : 2

配列の長さ : 687

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : 酵母

配列 :

Met Val Arg Thr Arg Val Leu Phe Cys Leu Phe Ile Ser Phe Phe	15
Ala Thr Val Gln Ser Ser Ala Thr Leu Ile Ser Thr Ser Cys Ile	30
Ser Gln Ala Ala Leu Tyr Gln Phe Gly Cys Ser Ser Lys Ser Lys	45
Ser Cys Tyr Cys Lys Asn Ile Asn Trp Leu Gly Ser Val Thr Ala	60
Cys Ala Tyr Glu Asn Ser Lys Ser Asn Lys Thr Leu Asp Ser Ala	75
Leu Met Lys Leu Ala Ser Gln Cys Ser Ser Ile Lys Val Tyr Thr	90
Leu Glu Asp Met Lys Asn Ile Tyr Leu Asn Ala Ser Asn Tyr Leu	105
Arg Ala Pro Glu Lys Ser Asp Lys Lys Thr Val Val Ser Gln Pro	120
Leu Met Ala Asn Glu Thr Ala Tyr His Tyr Tyr Tyr Glu Glu Asn	135
Tyr Gly Ile His Leu Asn Leu Met Arg Ser Gln Trp Cys Ala Trp	150

Gly Leu Val Phe Phe Trp Val Ala Val Leu Thr Ala Ala Thr Ile	165
Leu Asn Ile Leu Lys Arg Val Phe Gly Lys Asn Ile Met Ala Asn	180
Ser Val Lys Lys Ser Leu Ile Tyr Pro Ser Val Tyr Lys Asp Tyr	195
Asn Glu Arg Thr Phe Tyr Leu Trp Lys Arg Leu Pro Phe Asn Phe	210
Thr Thr Arg Gly Lys Gly Leu Val Val Leu Ile Phe Val Ile Leu	225
Thr Ile Leu Ser Leu Ser Phe Gly His Asn Ile Lys Leu Pro His	240
Pro Tyr Asp Arg Pro Arg Trp Arg Arg Ser Met Ala Phe Val Ser	255
Arg Arg Ala Asp Leu Met Ala Ile Ala Leu Phe Pro Val Val Tyr	270
Leu Phe Gly Ile Arg Asn Asn Pro Phe Ile Pro Ile Thr Gly Leu	285
Ser Phe Ser Thr Phe Asn Phe Tyr His Lys Trp Ser Ala Tyr Val	300
Cys Phe Met Leu Ala Val Val His Ser Ile Val Met Thr Ala Ser	315
Gly Val Lys Arg Gly Val Phe Gln Ser Leu Val Arg Lys Phe Tyr	330
Phe Arg Trp Gly Ile Val Ala Thr Ile Leu Met Ser Ile Ile Ile	345
Phe Gln Ser Glu Lys Val Phe Arg Asn Arg Gly Tyr Glu Ile Phe	360
Leu Leu Ile His Lys Ala Met Asn Ile Met Phe Ile Ile Ala Met	375

Tyr Tyr His Cys His Thr Leu Gly Trp Met Gly Trp Ile Trp Ser	390
Met Ala Gly Ile Leu Cys Phe Asp Arg Phe Cys Arg Ile Val Arg	405
Ile Ile Met Asn Gly Gly Leu Lys Thr Ala Thr Leu Ser Thr Thr	420
Asp Asp Ser Asn Val Ile Lys Ile Ser Val Lys Lys Pro Lys Phe	435
Phe Lys Tyr Gln Val Gly Ala Phe Ala Tyr Met Tyr Phe Leu Ser	450
Pro Lys Ser Ala Trp Phe Tyr Ser Phe Gln Ser His Pro Phe Thr	465
Val Leu Ser Glu Arg His Arg Asp Pro Asn Asn Pro Asp Gln Leu	480
Thr Met Tyr Val Lys Ala Asn Lys Gly Ile Thr Arg Val Leu Leu	495
Ser Lys Val Leu Ser Ala Pro Asn His Thr Val Asp Cys Lys Ile	510
Phe Leu Glu Gly Pro Tyr Gly Val Thr Val Pro His Ile Ala Lys	525
Leu Lys Arg Asn Leu Val Gly Val Ala Ala Gly Leu Gly Val Ala	540
Ala Ile Tyr Pro His Phe Val Glu Cys Leu Arg Leu Pro Ser Thr	555
Asp Gln Leu Gln His Lys Phe Tyr Trp Ile Val Asn Asp Leu Ser	570
His Leu Lys Trp Phe Glu Asn Glu Leu Gln Trp Leu Lys Glu Lys	585

Ser Cys Glu Val Ser Val Ile Tyr Thr Gly Ser Ser Val Glu Asp	600
Thr Asn Ser Asp Glu Ser Thr Lys Gly Phe Asp Asp Lys Glu Glu	615
Ser Glu Ile Thr Val Glu Cys Leu Asn Lys Arg Pro Asp Leu Lys	630
Glu Leu Val Arg Ser Glu Ile Lys Leu Ser Glu Leu Glu Asn Asn	645
Asn Ile Thr Phe Tyr Ser Cys Gly Pro Ala Thr Phe Asn Asp Asp	660
Phe Arg Asn Ala Val Val Gln Gly Ile Asp Ser Ser Leu Lys Ile	675
Asp Val Glu Leu Glu Glu Glu Ser Phe Thr Trp ***	687

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GACTCGAGTC GACATCG

17

配列番号 : 4

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

ACACTTATTA GCACTTCATG TATT

24

配列番号 : 5

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GAATTCTCTA GACTCCACCA TGGTTAGAAC CAGAGTCCTT TTCTGCCTCT TCATCTCTTT 60

CTTCGCTACA GTCCAATCGA GCG

83

配列番号 : 6

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GTTCAATCGA GCGCTACACT CATCTCCACT TCATGCATTT CTCAGGCTGC ACTGTACCAG 60

TTCGGATGCT CAAGCAAGTC AAA 83

配列番号 : 7

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CAAGCAAGTC AAAGTCTTGC TACTGCAAGA ACATCAATTG GCTCGGAAGC GTCAGTGCAT 60

GCGCTTATGA GAACTCCAAA TCT 83

配列番号 : 8

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TCCAGTGTGT AAACCTTGAT ACTTGAGCAT TGGCTGGCAA GTTTCATCAA AGCGGAGTCC 60

AGAGTCTTGT TAGATTGGA GTT 83

配列番号 : 9

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TGTCTTCTTA TCGGATTCT CAGGAGCGCG AAGGTAGTTA CTTGCATTAA GGTAGATGTT 60

CTTCATGTCC TCCAGTGTGT AAA 83

配列番号 : 10

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GGATCCCATG GTTTTCCTCA TAGTAGTAGT GATAGGCCGT CTCATTGCGC ATCAACGGTT 60

GTGAAACAAC TGTCTTCTTA TCG 83

配列番号 : 11

配列の長さ : 80

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GGATCCACTT GAATTTGATG CGATCTCAAT GGTGCGCATG GGCCTCGTC TTCTTCTGGG 60

TCGCAGTCCT TACCGCCGCA 80

配列番号 : 12

配列の長さ : 80

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CCTTACCGCC GCAACTATCT TGAACATTCT CAAACGCGTA TTCGGCAAGA ACATTATGGC 60

AAATTCTGTT AAGAAGTCTC 80

配列番号 : 13

配列の長さ : 80

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GTTAAGAAGT CTCTTATCTA CCCAAGCGTT TACAAAGACT ACAACGAGAG AACTTTCTAT 60

CTTTGGAAC GTTTGCCATT 80

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 8 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

AGAGTGAGAG AATAGTCAGA ATGACAAAGA TAAGAACTAC GAGTCCTTTG CCTCGAGTTG 60

TAAAGTTGAA TGGCAAACGT 80

配列番号 : 1 5

配列の長さ : 8 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

AATGCCATTG ATCTTCTCCA TCTAGGTCTA TCGTAAGGAT GTGGCAACTT GATGTTATGT 60

CCGAAAGAGA GTGAGAGAAT 80

配列番号 : 16

配列の長さ : 80

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TCCGGATACC GAAAAGGTAC ACCACGGGGA AAAGAGCGAT TGCCATCAAG TCAGCACGGC 60

GTGAGACGAA TGCCATTGAT 80

配列番号 : 17

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TCCGGAACAA CCCCTTCATC CCAATCACCG GATTGAGCTT TAGTACTTTC AACTTTTACC 60

ACAAAATGGTC AGCATACGTC TGC 83

配列番号 : 18

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GCATACGTCT GCTTCATGTT AGCCGTCGTC CATTCAATCG TTATGACCGC TTCAGGAGTT 60

AAACGAGGAG TATTCCAGTC TCT 83

配列番号 : 19

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TATTCCAGTC TCTTGTAAGG AAATTCTACT TCAGATGGGG AATAGTAGCC ACAATTCTTA 60

TGTCCATCAT CATTTTCCAG TCC 83

配列番号 : 20

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

ATAAACATGA TGTTTCATGGC TTTGTGAATA AGTAAGAAGA TTTCATAACC TCGGTCCTG 60

AAGACCTTCT CGGACTGGAA AAT 83

配列番号 : 21

配列の長さ : 83

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GAGGATGCCA GCCATGGACC AGATCCAGCC CATCCATCCT AGTGTGTGGC AATGGTAATA 60

CATAGCTATG ATAAACATGA TGT 83

配列番号 : 2 2

配列の長さ : 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GTCGACAAAG TGGCGGTCTT AAGACCTCCG TTCATGATGA TACGTACAAT TCGGCAGAAC 60

CTGTCGAAGC AGAGGATGCC AGC 83

配列番号 : 2 3

配列の長さ : 8 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GTCGACCACA GATGATTCTA ACGTTATCAA GATCTCTGTC AAGAAGCCTA AGTTCTTCAA 60

GTATCAAGTG GGAGCATTTG CC 82

配列番号 : 24

配列の長さ : 82

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GGAGCATTTG CCTATATGTA CTTTCTTTCA CAAAATCAG CCTGGTTCTA CAGTTTTCAA 60

TCTCATCCCT TCACAGTCCT AT 82

配列番号 : 25

配列の長さ : 82

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

TTCACAGTCC TATCAGAAAG GCACAGAGAT CCTAACAACC CAGATCAACT AACTATGTAC 60

GTCAAAGCTA ACAAGGGCAT TA 82

配列番号 : 26

配列の長さ : 82

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CCTCTAAGAA AATCTTGCAA TCAACGGTAT GGTTTGGAGC GCTTAGAACT TTGCTAAGAA 60

GTACTCTCGT AATGCCCTTG TT 82

配列番号 : 27

配列の長さ : 82

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GGCCCGCAGC TACTCCTACT AGATTTCTCT TAAGTTTGGC AATGTGAGGG ACAGTTACGC 60

CATATGGTCC CTCTAAGAAA AT 82

配列番号 : 28

配列の長さ : 82

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CTGCAGTTGA TCAGTGCTAG GCAATCTAAG GCATTCTACG AAATGGGGGT AGATGGCTGC 60

CACGCCGAGG CCCGCAGCTA CT 82

配列番号 : 29

配列の長さ : 77

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CTGCAGCACA AGTTCTACTG GATCGTCAAC GACCTTAGTC ACCTTAAGTG GTTCGAAAAC 60

GAGCTACAAT GGCTTAA 77

配列番号 : 30

配列の長さ : 77

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

ACAATGGCTT AAGGAGAAAT CTTGTGAAGT CTCTGTCATC TACTGTTGGT CATCAGTGGA 60

GGATACAAAC TCAGATG 77

配列番号 : 31

配列の長さ : 77

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CAAATCAGA TGAGTCCACT AAGGGTTTCG ATGACAAGGA AGAATCTGAA ATCACCGTAG 60

AATGCCTTAA CAAGAGG 77

配列番号 : 32

配列の長さ : 77

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

GTGATGTTGT TGTCTCGAG TTCTGACAAT TTGATCTCTG ATCTCACTAG CTCTTTGAGG 60

TCTGGCCTCT TGTTAAG 77

配列番号 : 33

配列の長さ : 77

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

CGATACCTTG TACAACTGCA TTCCTAAAGT CGTCATTGAA AGTCGCTGGT CCGCATGAGT 60

AGAAAGTGAT GTTGTTG 77

配列番号 : 34

配列の長さ : 77

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : primer bind

配列 :

AAGCTTGAGC TCTTACCAAG TAAAACTCTC CTCCTCTAGT TCGACATCTA TCTTCAGACT 60

AGAATCGATA CCTTGTA 77

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、植物の鉄分の吸収機構（I）を示すものである。

【図2】

図2は、植物の鉄分の吸収機構（II）を示すものである。

【図3】

図3は、高等植物におけるポリ（A）付加の位置を示すものである。

【図4】

図4は、酵母の遺伝子FRE1のG及びTがリッチな配列を示すものである。

【図5】

図5は、Refre1の合成法の概念を示すものである。

【図6】

図6は、refre1の合成に使用した30本のプライマーの配列を示すもの

である。

【図7】

図7は、refrelの配列と設定したプライマーとの関係を示すものである。

【図8】

図8は、refrelの全長の作成方法を示すものである。

【図9】

図9は、設計したrefrelの全配列を示すものである。

【図10】

図10は、FRE1（上段）とrefrelのG及びTの含有量を連続する8塩基単位で計算してグラフ化したものである。

【図11】

図11は、バイナリーベクターpRF1の構造を示すものである。

【図12】

図12は、本発明の形質転換された植物の生育を示す写真である。

【図13】

図13は、本発明の形質転換された植物の開花状況を示す写真である。

【図14】

図14は、refrelをプローブとした形質転換体のサザンハイブリダイゼーションの結果を示すものである。左側はEcoRIとHindIIIの両者による消化の場合であり、右側はHindIIIでの消化によるものである。No. 1～No. 12は形質転換体であり、W. T. は野生型である。

【図15】

図15は、refrelをプローブとした形質転換体のノーザンハイブリダイゼーションの結果を示すものである。No. 1及びNo. 2は形質転換体を示し、W. T. は野生型である。

【図16】

図16は、根における三価鉄還元酵素の活性を、Fe(II)によるBPDS-Fe(II)複合体の赤い発色を示す写真である。左側は野生型であり、赤い発色

はみられないが、右側の形質転換体の根では赤い発色が確認できる。

【図 17】

図 17 は、別の形質転換体を用いて図 16 と同じ実験を繰り返した場合の写真であり、形質転換体（右側）に赤い発色が確認できる。

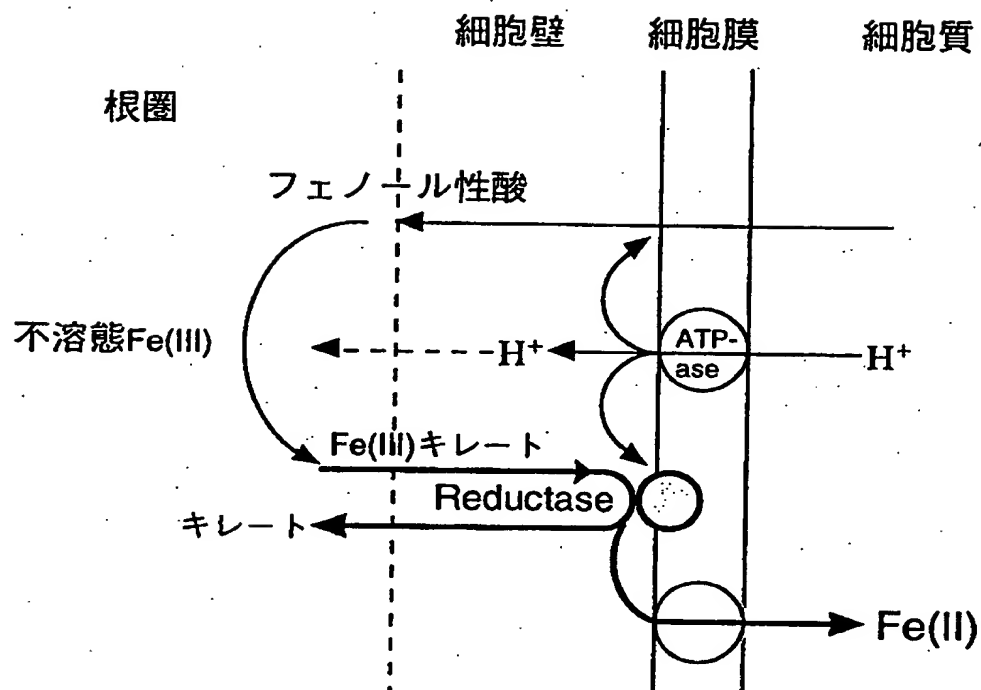
【図 18】

図 18 は、形質転換体の種から得られた 2 世代目を用いた根における三価鉄還元酵素の活性を、B P D S - F e (II) 複合体の赤い発色により示した写真である。形質転換体の 2 世代目（左側）にも B P D S - F e (II) 複合体による赤い発色が確認できた。

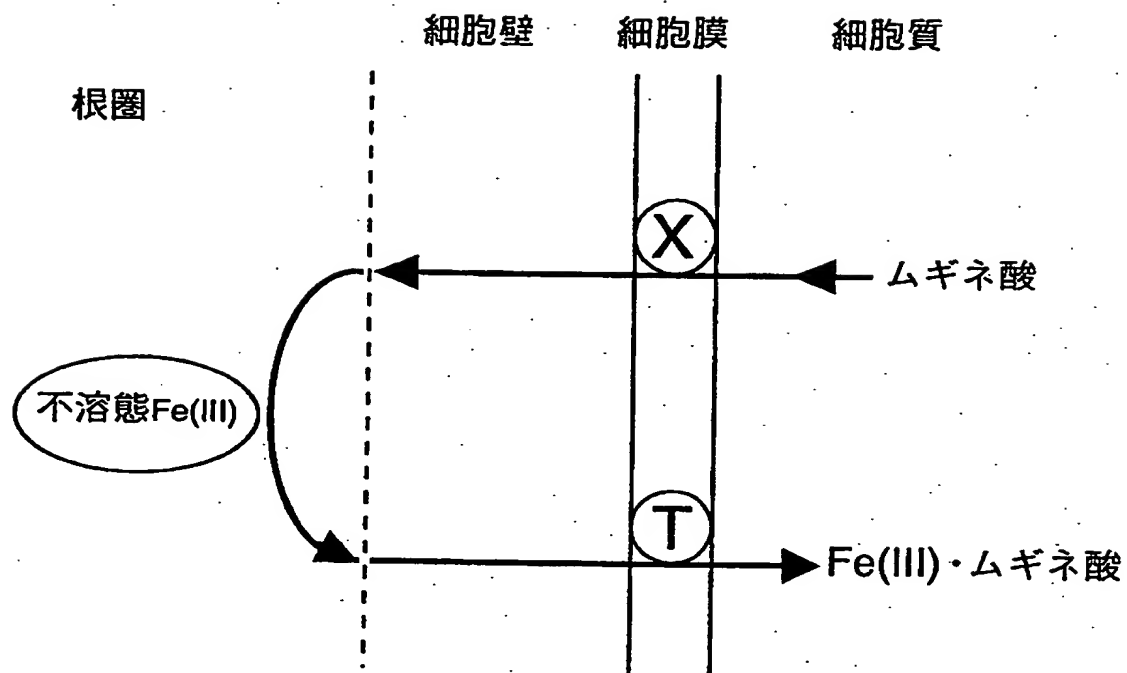
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



高等植物の 2 種類の鉄獲得機構

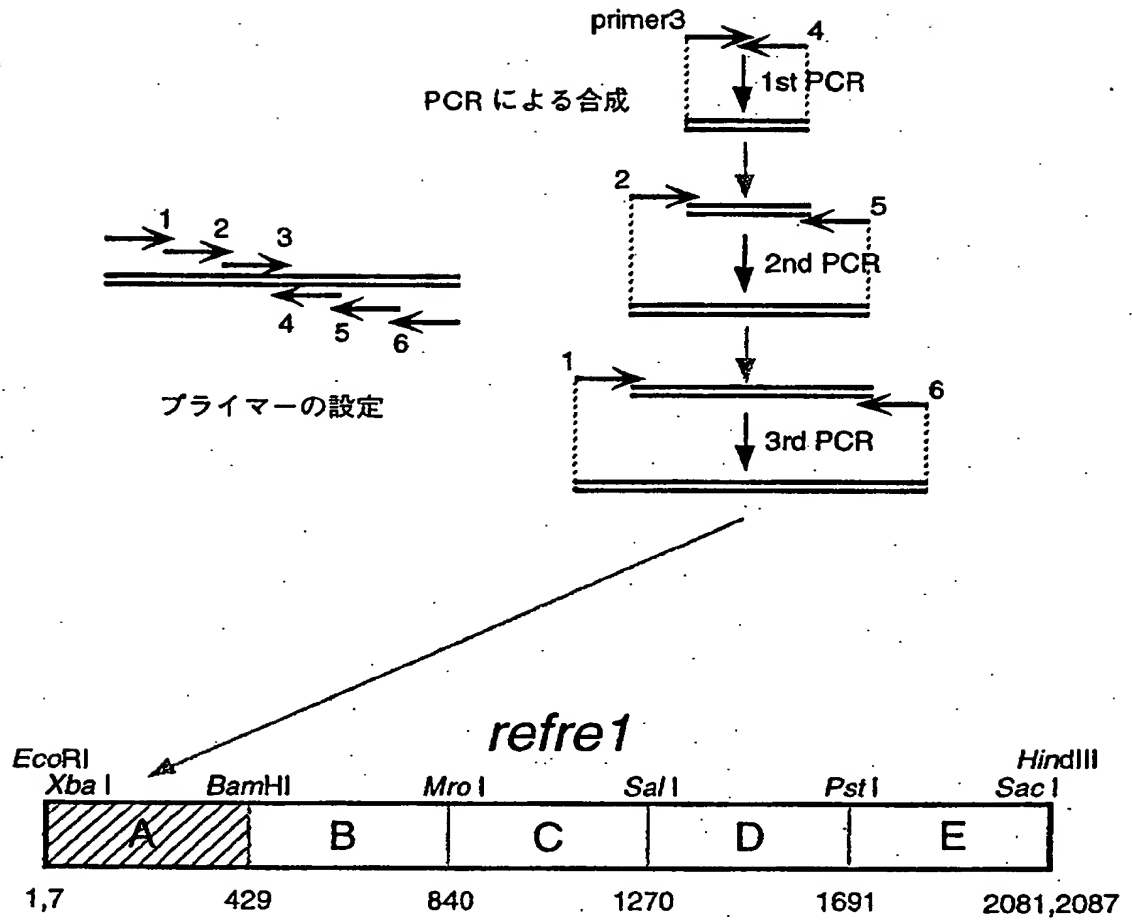
【図3】

	putative poly(A) signal	poly(A) site		putative poly(A) signal	poly(A) site	
541	TCGTC	CACTTATT	ACCTCTGTTTACAAGATTAT	ATGAACGAACTTTTATT	ATGGAAGCGTCTACCATTTAATTTT	630
181	S V K K S L I Y P S V Y K D Y N E R T F Y L W K R L P F N F					210
	putative poly(A) signal	poly(A) site		putative poly(A) signal	poly(A) site	
631	CAACTCGAGGCAAGGCTCTCGTCG	TATTAA	TTTTTGT	TATTTTGACTATATTATCTCTCAGTTTGGTCATAATATTAACTTCCACAC		720
211	T T R G K G L V V L I F V I L T I L S L S F G H N I K L P H					240

【图 4】

1	ATGGTTAGAACCCGTGTATTATTCTGCTTATTTATATCTTTTTTGGCTACGGTCAATCG	60
61	AGTGCTACACTTATTAGCACTTCATGTATTTCCCAAGCTGCGCTATACCAATTTGGATGT	120
121	TCTAGTAAATCTAAAAGTTGCTACTGTAAAAACATCAATTGGCTGGGTTCACTGACAGCA	180
181	TGTGCCTATGAGAATTCCAAATCTAACAAACACTAGACAGCGCCTTAATGAAGTTAGCA	240
241	TCCCAATGTTCAAGCATCAAAGTTTATACTTTAGAGGACATGAAGAATATTTATTTAAAT	300
301	GCGTCAAATTATTTGAGAGCACCTGAGAAAAGTGATAAAAAAACCGTGGTTAGTCAACCG	360
361	CTCATGGCGAACGAGACAGCGTATCATTATTATTATGAGGAAAATTATGGTATCCATCTT	420
421	AACCTAATGCGCTCTCAATGGTGGCTGGGGTCTGGTCTCTCTGGGGTGGGTGTGGT	480
481	ACTGCAGCCACTATCTTGAACATTCTGAAAAAGGTGTTGGTGAAGACATCATGGCAAAC	540
541	TCCGTCAAAAATCACTTATTTATCCTTCTGTTTACAAAGATTATAATGAACGAACTTTT	600
601	TATTTATGGAAGCGTCTACCATTTAATTTTACAACCTCGAGGCAAGGGTCTCGTCGTATTA	660
661	AATTTGTTATTTGACTATATTATCTCTCAGTTTTGGTCATAATATTAACCTCCACAC	720
721	CCATATGATAGGCCAGATGGAGAAGAAGTATGGCCTTTGTGAGTCGTAGAGCAGACTTG	780
781	ATGGCCATTGCACTTTTCCAGTAGTCTATCTATTGGGAATAAGAAATAATCCCTTCATC	840
841	CCTATAACAGGGCTTTCTTTTCTACATTTAATTTCTATCATAAATGGTCTGCCTACGTT	900
901	TGTTTCATGTTGGCCGTTGTACACTCAATTGTCATGACCGCCTCGGGAGTGAAAAGAGGT	960
961	GTTGTTCAAAGTCTGGTTAGGAAATTTTACTTGGTGGGTATAGTGGCAACGATATTA	1020
1021	ATGTCTATTATTATTTTCCAAAGTGAAAAAGTATTTAGAAATAGAGGGTATGAGATATTC	1080
1081	CTTCTTATTCATAAAGCGATGAATATTATGTTTATTATTGCCATGTACTACCATTTGTCAC	1140
1141	ACCCGGGCTGGATGGGTGGATTTGGTCAATGGCTGGTATTTATGCTTTGATAGATTC	1200
1201	TGCAGGATTGTTAGAATAATCATGAATGGTGGCTTGAAAACTGCTACTTTGAGTACCACT	1260
1261	GATGATTCTAATGTTATTAAAAATTCAGTAAAAAACCAAAGTTTTTCAAGTACCAAGTA	1320
1321	GGAGCTTTGCGATACATGTATTTCTTATCACCAAAAAGTGCATGGTTCTATAGTTTCCAA	1380
1381	TCACATCCATTTACAGTATTATCGGAACGACACCGTGATCCAAACAATCCAGATCAATTG	1440
1441	ACGATGTACGTAAAGGCAATAAAGGTATCACTCGAGTTTTGTTATCGAAAGTTCTAAGT	1500
1501	GCTCCAAATCATACTGTTGATTGTAAATATTCCTTGAAGGCCCATATGGTGTAAACGGTT	1560
1561	CCACATATCGCTAAGCTAAAAAGAAATCTGGTAGGTGTAGCCGCTGGTGGGTGTTGCG	1620
1621	GCTATTTATCCGCACTTTGTGGAATGTTTACGGTTACCATCTACTGATCAACTTCAGCAT	1680
1681	AAATTTTACTGGATTGTTAATGACCTATCCATTTGAAATGGTTTGAAAATGAATTGCAA	1740
1741	TGGTTAAAGGAGAAAAGTTGTGAAGTCTCAGTCATATACTGGTTCCAGTGTGAGGAC	1800
1801	ACAAATTCAGATGAGAGTACAAAAGGTTTTGATGATAAAGAAGAAAGCGAAATCACTGTT	1860
1861	GAATGTCTCAATAAAAGACCTGATTTGAAAGAACTAGTGCCTCGGAAATAAACTCTCA	1920
1921	GAAGTAGAGAATAATAATATTACCTTTTATTCCTGCGGGCCAGCAACGTTTAAACGACGAT	1980
1981	TTTAGAAATGCAGTGGTCCAAGGTATAGACTCTTCCTTGAAGATTGACGTTGAAGTAGAA	2040
2041	GAAGAAAGTTTTACATGGT	2059

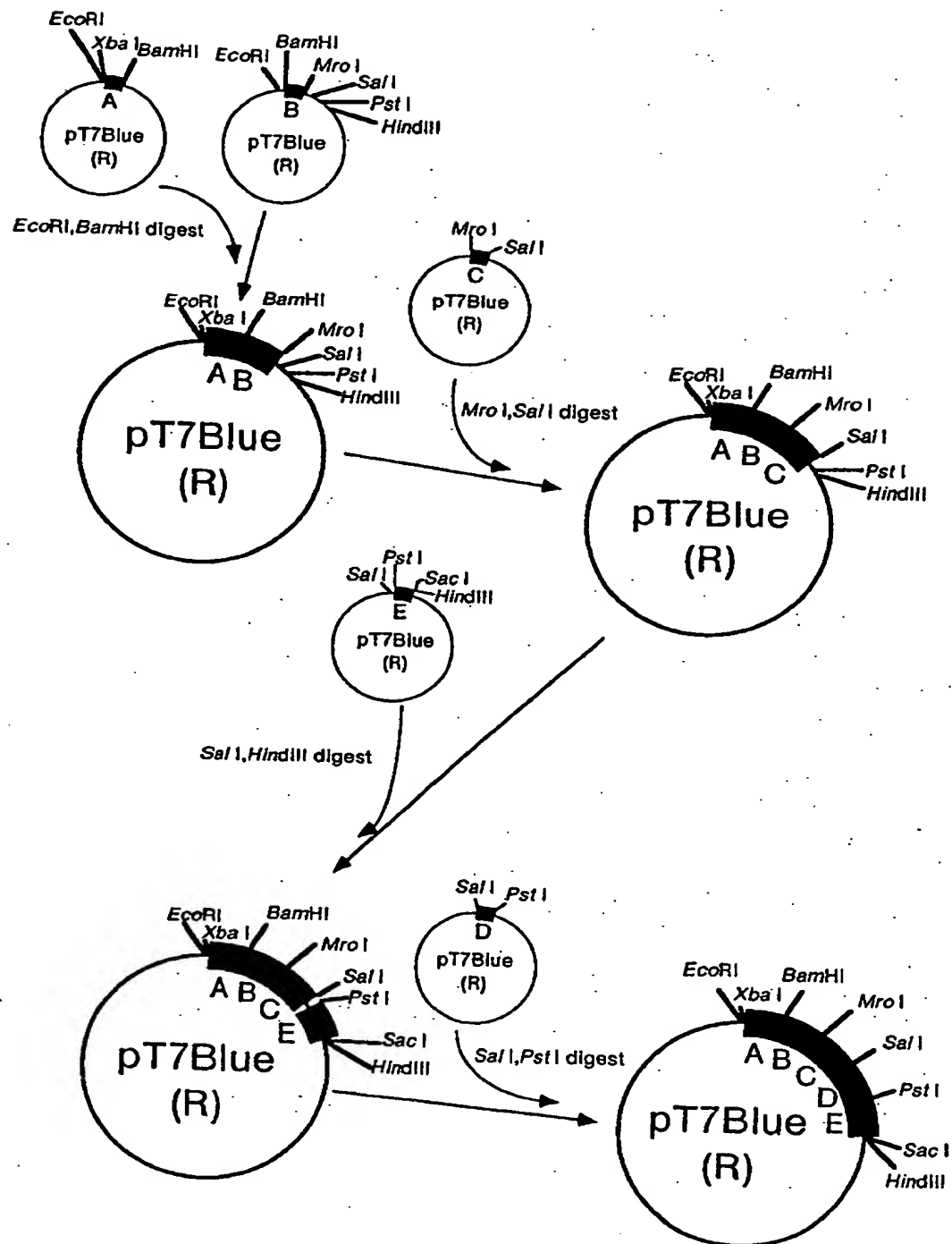
【図 5】



【図 6】

配列名	塩基配列	
	5' 3'	
A-1	GAATTCCTAGACTCCACCATGGTTAGAACCAGAGTCTTTTCTGCTCTTCATCTCTTTCTTGGCTACAGTCCAATGAGGG	83mer
A-2	GTCCAATGAGGGCTACACTCATCTCCACTTCATGCAATTTCTCAGGCTGCAGTGTACCAAGTTGGATGCTCAAGCAAGTCAAA	83mer
A-3	CAAGCAAGTCAAGTCTTGCTACTGCAAGAACATCAATTGGCTGGAGGGTCACTGCATGGCTTATGAGAACTCCAAATCT	83mer
A-4	TDCAGTGTGTAACCTTGATACTTGAGCATTGGCTGGCAAGTTTCATCAAAGGGAGTCCAGAGTCTTGTTAGATTGGAGTT	83mer
A-5	TGTCTTCTTATGGATTTCCTCAGGAGGGGGAAGGTAGTTACTTGCATTAAGGTAGATGTTCTTCATGTCTCCAGTGTGTAA	83mer
A-6	GGATCCCATAGTTTTCCTCATAGTAGTAGTGATAGGGGCTCATTTGGCATCAAGGGTTGTGAACAACGTGTCTCTTATOG	83mer
B-1	GGATCCACTTGAATTTGATGGATCTCAATGGTGGCATGGGGCTGGTCTTCTTCTGGGTGGCAGTCTTACGGGGCA	80mer
B-2	CCCTACGGGGCAACTATCTTGAACATTTCTAAAGGGTATTGGCAAGAACATTATGGCAAAATCTGTTAAGAAGTCTC	80mer
B-3	GTTAAGAAGTCTCTTATCTACCCAAGGGTTTACAAGACTACAAGAGAGAACTTTCTATCTTTGGAAAAGTTTGCCATT	80mer
B-4	AGAGTGAGAGAAAGTGAATGACAAAGATAAGAACTAAGAGTCTTTGGCTGGAGTTGTAAAGTTGAATGGCAAGGT	80mer
B-5	AATGCCATTGATCTCTCCATCTAGGTCTATGGTAAGGATGTGGCAACTTGTGTTATGTGGAAAAGAGAGTGAGAGAAT	80mer
B-6	TCCGGATACGGAAAAGGTACCAAGGGGAAAAGAGGGATTGGCATCAAGTCAGCACGGGCTGAGAGCAATGCCATTGAT	80mer
C-1	TCCGGAACAAAGCTTCATCCCAATCAAGGATTGAGCTTTAGTACTTTCACTTTTACCAAAATGGTCAGCATAGTCTGC	83mer
C-2	GCATAGCTCTGCTTCATGTTAGGGGTGGTCAATTCATGGTTATGACGGCTTCAGGAGTTAAAGAGGAGTATTCCAGTCTCT	83mer
C-3	TATTCAGTCTCTTGTAAGGAAATCTACTTCAGATGGGGAATAGTAGCCAAATCTTATGTCCATCATCATTTTCCAGTCC	83mer
C-4	ATAAATCATGATGTTTCTGCTTTGTAATAAGTAAGAAGATTTCATAAAGCTGGTTCCTGAAGAACTTCTGGAGCTGGAAAT	83mer
C-5	GAGGATGCCAGCATGGACAGATCCAGCCATCCATCTAGTGTGTGGCAATGGTAATACATAGCTATGATAAATCATGAT	83mer
C-6	GTCACAAAGTGGGGTCTTAAGAACTCCGTTTCATGATGATACGTACAATTCGGCAGAACTGTGGAGCAGAGGATGCCAGC	83mer
D-1	GTCAGCACAGATGATTCTAAGGTATCAAGATCTCTGTCAAGAAGCTAAGTCTTCAAGTATCAAGTGGGAGCATTTGGC	82mer
D-2	GGAGCATTTGGCTATATGATCTTTCTTCAAAAATCAGCTGGTCTACAGTTTCAATCTCATCCCTTCACAGTCTAT	82mer
D-3	TTACAGTCTATCAGAAAGGCACAGAGATCTAACAACCCAGATCAACTAATATGTAAGTCAAGCTAACAAGGGCATT	82mer
D-4	CCTCTAAGAAAATCTTGCAATCAAGGTATGGTTTGGAGGGCTTAGAACTTTGCTAAGAAGTACTCTGGTAATGGCTTGT	82mer
D-5	GGCCCGCAGCTACTCTACTAGATTTCTTTAAGTTTGGCAATGTGAGGGACAGTTACGGCATATGGTCCCTTAAGAAAAT	82mer
D-6	CTGCAGTTGATCAGTCTAGGCAATCTAAGGCATTCTADGAAATGGGGTAGATGGCTGCCAGGGGAGGGGGCAGCTACT	82mer
E-1	CTGCAGCACAAAGTTCTACTGGATGTCAAGGACCTTAGTCACTTAAAGTGGTTGGAAAAGAGCTACAATGGCTTAA	77mer
E-2	ACAATGGCTTAAGGAGAAATCTTGTAAGTCTCTGTGATCTACACTGGGTCACTAGTGGAGGATACAAACTCAGATG	77mer
E-3	CAAACTCAGATGATCCACTAAGGGTTTGGATGACAAGGAAGATCTGAAATCAAGTGAATGGCTTAAACAAGAGG	77mer
E-4	GTGATGTTGTTGTTCTGGAGTTCTGAACAATTTGATCTCTGATCTCAGTCTTTGAGGTCTGGGCTCTTGTTAAG	77mer
E-5	CGATACCTTGTACAACGTGATTTCTAAAGTGTGATTAAGTGGTGGTCCGATGAGTAGAAAGTGTGTTGTTG	77mer
E-6	AAGCTTGAGCTCTTACCAAGTAAACTCTCTCTCTAGTTGGACATCTATCTTCAGACTAGAATGATACTTGTGTA	77mer

【図 8】

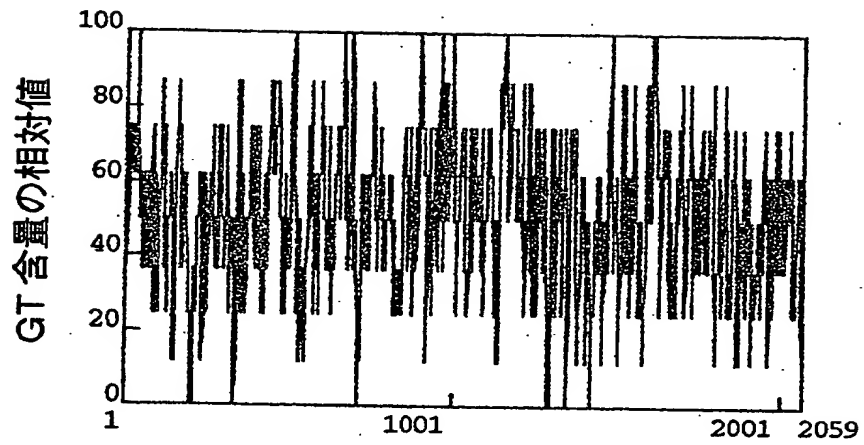


【図9】

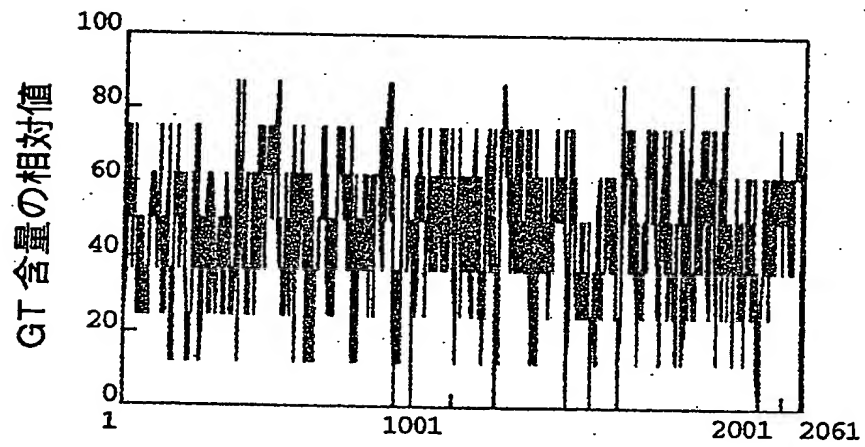
	gaattctctagactccacc	19
20	ATGGTTAGAACAGAGTCCTTTTCGCTCTTCATCTCTTTCTGCTACAGTCCAATCGAGCGCTACACTCATCTCCACTTCATGCATT	109
1	M V R T R V L F C L F I S F F A T V O S S A T L I S T S C I	30
110	TCTCAGGCTGCACGTGTACAGTTCGGATGCTCAAGCAAGTCAAAGTCTTGCTACTGCAAGAACATCAATTGGCTCGGAAGCGTCACTGCA	199
31	S O A A L Y O F G C S S K S K S C Y C K N I N W L G S V T A	60
200	TGGCTTATGAGAACTCAAATCTAACAAGACTTGGACTCCGCTTTGATGAAACTTGCCAGCCAATGCTCAAGTATCAAGTTTACACA	289
61	C A Y E N S K S N K T L D S A L M K L A S O C S S I K V Y T	90
290	CTGGAGGACATGAAGACATCTACCTTAATCAAGTAACTACCTTCGCGCTCTGAGAAATCCGATAAGAAGACAGTTGTTTACAAACCG	379
91	L E D M K N I Y L N A S N Y L R A P E K S D K K T V V S O P	120
380	TTGATGGCAAATGAGACGGCTATCACTACTACTATGAGGAAACTATGGGATCCACTTGAATTTGATGCGATCTCAATGGTGCGCATGG	469
121	L M A N E T A Y H Y Y Y E E N Y G I H L N L M R S O W C A W	150
470	GGCTCGTCTTCTTGGGTGGAGCTCTTACCGCGCAACTATCTTGAACATCTCAAACCGCTATTGCGCAAGAACATTATGCAAAAT	559
151	G L V F F W V A V L T A A T I L N I L K R V F G K N I M A N	180
560	TCTGTAAAGAGTCTCTTATCTACCAAGCGTTTACAAGACTACAACGAGAGAACTTTCTATCTTTGGAAGCGTTTGCCATTCAACTTT	649
181	S V K K S L I Y P S V Y K D Y N E R T F Y L W K R L P F N F	210
650	ACAACCTGAGGCAAGGACTCGTAGTCTTATCTTTGTCTTCTGACTATTCTCTCACTCTCTTTGCGACATAACATCAAGTTGCCACAT	739
211	T T R G K G L V V L I F V I L T I L S L S F G H N I K L P H	240
740	CCTTACGATAGACCTAGATGGAGAAGTCAATGGCATTGCTCTCACGCGTCTGACTTGATGGCAATCGCTCTTTTCCCGTGGTGATC	829
241	P Y D R P R W R R S M A F V S R R A D L M A I A L F P V V Y	270
830	CTTTTCGGTATCGGAACAACCCCTTCATCCCAATCACCGATTGAGCTTTAGTACTTTCAACTTTTACCACAAATGTCAGCATAGTC	919
271	L F G I R N N P F I P I T G L S F S T F N F Y H K W S A Y V	300
920	TGCTTCATGTTAGCGGTGCTCAATTCAATCGTTATGACCGCTTCAGGAGTTAAACGAGGAGTATTCAGTCTCTTGTAAAGAAATCTAC	1009
301	C F M L A V V H S I V N T A S G V K R G V F O S L V R K F Y	330
1010	TTGATGAGGGAATAGTAGCCACAATCTTATGTCATCATCATTTTCCAGTCCGAGAAGGCTTTCAGGAACCGAGGTTATGAAATCTTC	1099
331	F R W G I V A T I L M S I I I F Q S E K V F R N R G Y E I F	360
1100	TTACTTATTACAAAGCCATGAACATCATGTTTATCATAGTATGATTACCATGCCACACACTAGGATGGATGGCTGGATCTGGTCC	1189
361	L L I H K A M N I M F I I A M Y Y H C H T L G W M G W I W S	390
1190	ATGGCTGGCATCTCTGCTTCGACAGGTTCTCGCAATTGTACGTATCATGACGAGGCTTAAAGACCGCCACTTTGTGACCCACA	1279
391	M A G I L C F D R F C R I V R I I M N G G L K T A T L S T T	420
1280	GATGATTCTAAGCTTATCAAGATCTCTGTCAGGAAGCTAAGTTCTTCAAGTATCAAGTGGGAGCATTGCTATATGTAATCTTTCA	1369
421	D D S N V I K I S V K K P K F F K Y O V G A F A Y M Y F L S	450
1370	CCAAATCAGCTGGTCTACAGTTTCAATCTCATCCCTTCACAGTCTATCAGAAAGGCACAGAGATCTAACAACCCAGATCAACTA	1459
451	P K S A W F Y S F O S H P F T V L S E R H R D P N N P D O L	480
1460	ACTATGTACGTCAAAGCTAACAAGGGCATTACGAGAGTACTTCTAGCAAAGTTCTAAGCGCTCCAAACCATACCGTTGATTGCAAGATT	1549
481	T M Y V K A N K G I T R V L L S K V L S A P N H T V D C K I	510
1550	TTCTTAGAGGACCATATGGCGTAACGTCTCCCTCACATTGCCAAACTAAGAGAAATCTAGTAGGAGTACCTGCGGCTCGCGTGGCA	1639
511	F L E G P Y G V T V P H I A K L K R N L V G V A A G L G V A	540
1640	GCCATCTACCCCATTTTCGTAGAATGCTTAGATTGCTAGCACTGATCAACTGCAGCACAAGTTCTACTGGATCGTCAACGACCTTAGT	1729
541	A I Y P H F V E C L R L P S T D O L O H K F Y W I V N D L S	570
1730	CACCTTAAGTGGTTCGAAAACGAGCTACAATGGCTTAAGGAGAAATCTTGTAAGTCTCTGTCATCTACACTGGGTATCAGTGGAGGAT	1819
571	H L K W F E N E L O W L K E K S C E V S V I Y T G S S V E D	600
1820	ACAACTCAGATGAGTCCACTAAGGGTTTCGATGACAAGGAAGATCTGAAATCACCGTAGAATGCTTAAACAAGAGGCCAGACCTCAAA	1909
601	T N S D E S T K G F D D K E E S E I T V E C L N K R P D L K	630
1910	GAGCTAGTGAATCAGAGATCAAAATGTGAGAACTGAGAAACAACATCACTTTCTACTCATGCGGACCGAGCTTTCAATGACGAC	1999
631	E L V R S E I K L S E L E N N N I T F Y S C G P A T F N D D	660
2000	TTTAGGAATGAGTTGTACAAGGTATCGATTCTAGTCTGAAGATAGATGTGGAACAGAGGAGAGTTTACTTGGTAAgagctcaag	2089
661	F R N A V V O G I D S S L K I D V E L E E E S F T W *	687
2090	c1t	2092

【図 10】

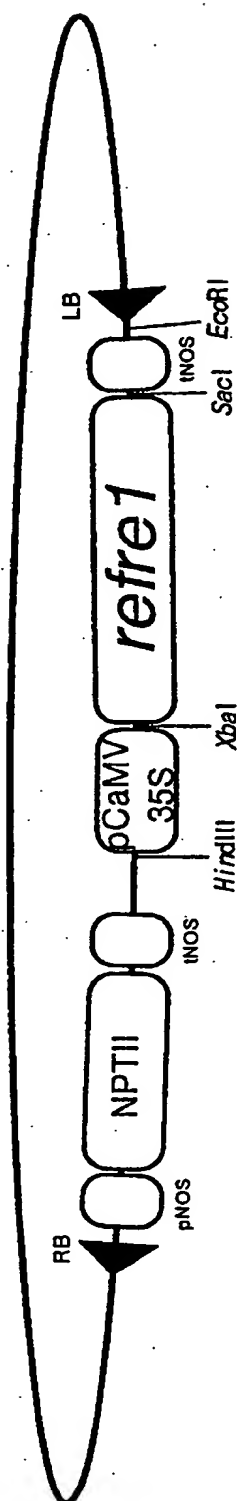
FRE1



refre1



【図 11】



【図 12】

図面代用写真

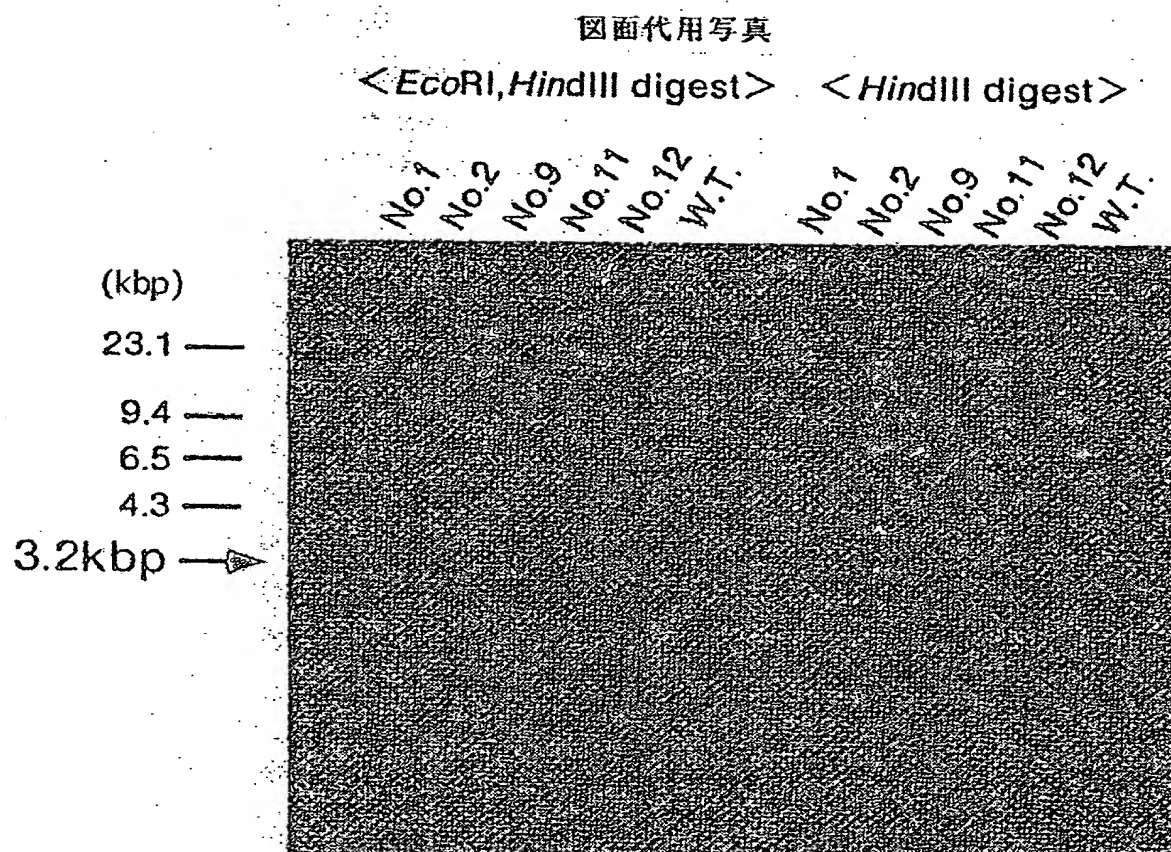


【図13】

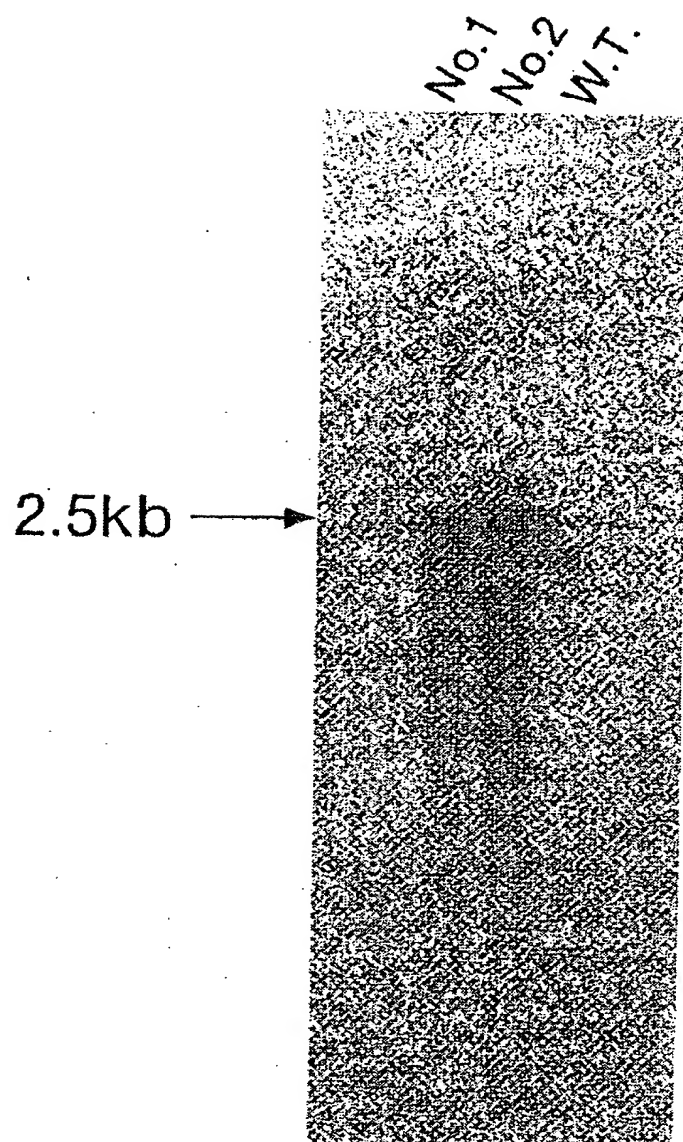
図面代用写真



【図 14】



【図 15】



図面代用写真

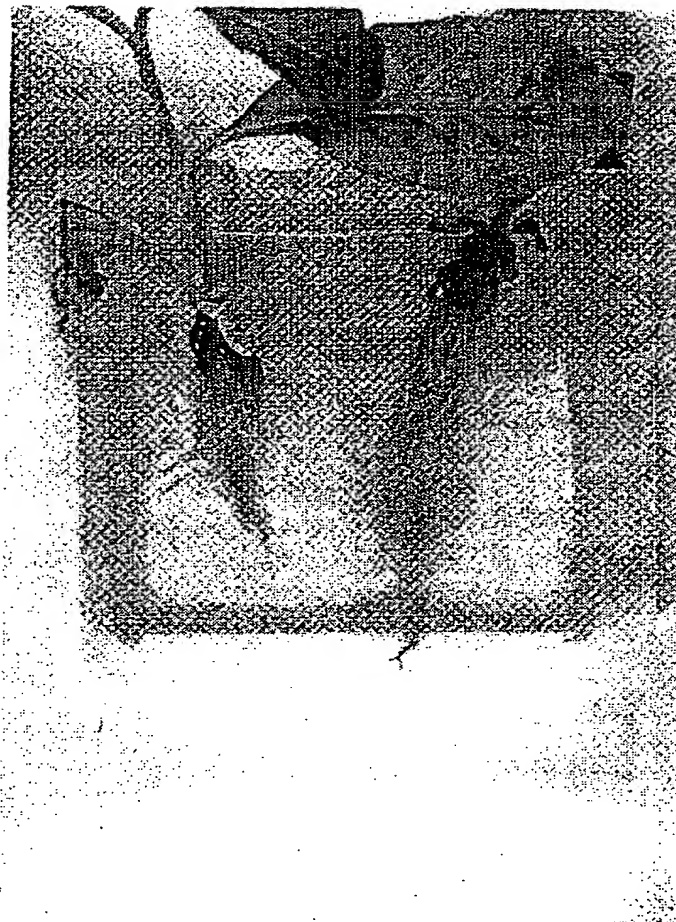
【図16】

図面代用写真



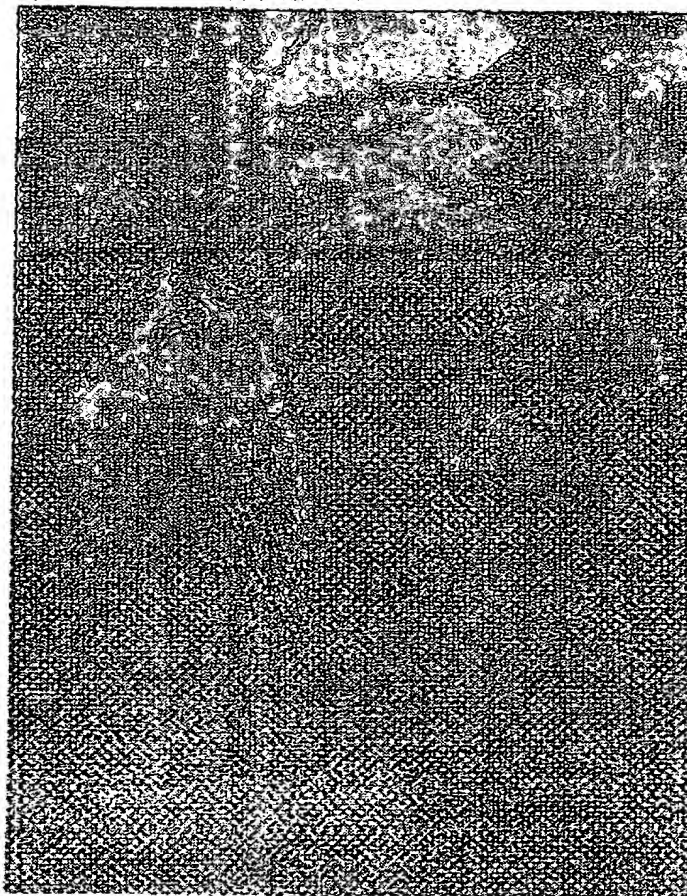
【図17】

図面代用写真



【図18】

図面代用写真



T₂植物

【書類名】 要約書

1 / 1

【要約】

【課題】 有用な高等植物に他の生物が有している機能を付加するために、当該機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を、高等植物に導入して形質転換された高等植物において、当該導入遺伝子が十分に発現するための方法を提供するものである。

【解決手段】 本発明は、有用植物に他の種の遺伝子を導入して有用植物を形質転換する方法において、導入される他の遺伝子がコードする蛋白質が有する機能を実質的に変更することなく、当該他の遺伝子の塩基配列中に存在する形質転換される有用植物の mRNA のポリ（A）付加に関する要素の領域を、mRNA のポリ（A）付加に関係しないような他の塩基配列に改変することを特徴とする有用植物を形質転換する方法、及び、それに用いる導入遺伝子に関する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】 申請人
【識別番号】 100102668
【住所又は居所】 東京都台東区台東1丁目30番9号 第二ツチャピ
ル 9階 たくみ特許事務所
【氏名又は名称】 佐伯 憲生

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

